

**OPTIMIZACION DEL PRETRATAMIENTO CON PEROXIDO DE HIDROGENO
ALCALINO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR PARA LA PRODUCCION
DE GLUCOSA**

**LAURA LILIANA GARZON FUENTES
SANDRA MARCELA GOMEZ RUEDA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2007

**OPTIMIZACION DEL PRETRATAMIENTO CON PEROXIDO DE HIDROGENO
ALCALINO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR PARA LA PRODUCCION
DE GLUCOSA**

**LAURA LILIANA GARZON FUENTES
SANDRA MARCELA GOMEZ RUEDA**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

Rubens Maciel Filho

Ingeniero Químico Ph.D

UNIVERSIDAD ESTATAL DE CAMPINAS

Codirector

Viatcheslav Kafarov Kafarov

Ingeniero Químico Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2007

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

UNIVERSIDAD ESTATAL DE CAMPINAS UNICAMP, FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA FEQ. Por su confianza en nuestro desempeño al permitirnos contar con todos los medios necesarios para realizar esta investigación, así como las instalaciones donde fue realizada la experimentación.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA. Por la oportunidad de la pasantía investigativa en la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP).

Dr. Rubens Maciel Filho. Por sus valiosas orientaciones y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Grupo de investigación. Laboratorio de Bioprocesos. Dra Aline Carvalho da Costa. Por su dedicación y apoyo económico para el desarrollo de la experimentación.

Master Sarita Candida Rabelo. Por su tiempo constante y sus valiosos conocimientos encaminados al perfeccionamiento de esta investigación.

A **DIOS** quien genera dia a dia la sabiduría en mí.

A mi familia por su inmenso amor.

Sandra Marcela Gómez Rueda

A **Dios**, mis padres y hermanas, por brindarme
su gran amor y apoyo para lograr uno de los
objetivos más grandes de mi vida.

Laura Liliana Garzón Fuentes

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	18
1. MARCO TEORICO	20
1.1 Caña de azúcar	20
1.2 Composición química de los materiales lignocelulósicos	20
1.2.1 Celulosa	20
1.2.2 Hemicelulosa	21
1.2.3 Lignina	21
1.3 Pretratamiento	21
1.3.1 Tipos de pretratamiento	22
1.3.1.1 Pretratamiento químico	22
1.3.1.1.1 Pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	22
1.3.1.1.2 Pretratamiento con H_2O_2	23
1.4 Hidrólisis enzimática	23
1.4.1 Enzimas celulasas	24
1.4.2 Método de acción de las celulasas: sinergismo	24
1.4.3 Principales factores que afectan la hidrólisis enzimática	25
1.4.3.1 Sustrato	25
1.4.3.2 Celulasa	26
1.4.3.3 Condiciones reaccionales	26
1.5 Planeamiento experimental	26
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	27
2.1 Materiales	27
2.1.1 Reactivos	27
2.1.2 Equipos	28
2.1.3 Materia prima	29
2.1.4 Preparacion del bagazo de caña de azúcar	29

2.1.5	Separación de la muestra	29
2.1.6	Enzimas	29
2.2	Procedimiento experimental	30
2.2.1	Determinación de la concentración de ART	30
2.2.1.1	Cuantificación de los ART	30
2.2.2	Determinación de la concentración de glucosa	30
2.2.2.1	Cuantificación de glucosa	30
2.2.3	Determinación de la actividad de las enzimas	31
2.2.3.1	Determinación de la actividad de la celulasa	31
2.2.3.2	Determinación de la actividad de la β -glucosidasa	31
2.2.4	Planeamiento experimental de los pretratamientos	31
2.2.4.1	Reacciones del pretratamiento	32
2.2.4.2	Hidrólisis del bagazo pretratado	32
2.2.4.3	Cuantificación de los ART y glucosa	33
2.2.4.4	Análisis de resultados a través de STATISTICA 7.0	33
3.	RESULTADOS Y ANALISIS	33
3.1	Cálculo de la humedad teórica del bagazo de caña de azúcar	33
3.2	Planeamiento experimental de los pretratamientos	34
3.2.1	Planeamiento factorial del pretratamiento con Ca(OH)_2	34
3.2.2	Planeamiento factorial del pretratamiento con H_2O_2 alcalino	38
3.2.3	Determinación de los efectos principales e interacción de las variables	41
3.2.3.1	Análisis de masa de glucosa bagazo in-natura	42
3.2.3.2	Análisis de masa de glucosa bagazo tamizado	43
3.3	Optimización del mejor pretratamiento	44
3.3.1	Planeamiento estrella del pretratamiento	45
3.3.2	Determinación de los efectos principales e interacción de las variables	48
3.3.3	Análisis de masa de glucosa	49
3.4	Estudio del tiempo del pretratamiento	50
3.5	Estudio de la temperatura del pretratamiento	50

3.6 Analisis del pretratamiento optimizado	50
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIÓN	54
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Pretratamiento en los materiales lignocelulósicos.	21
Figura 2. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa y de la acción del CBHs, EGs, y β -glucosidasas (β -gluc) de <i>Trichoderma reesei</i> .	25
Figura 3. Masa de bagazo <i>in-natura</i> y tamizado antes y después del pretratamiento.	35
Figura 4. Masa de bagazo <i>in-natura</i> y tamizado con y sin pretratamiento antes y después del proceso de hidrólisis.	36
Figura 5. Perfil de hidrólisis del ensayo 1.	36
Figura 6. Perfil de hidrólisis del ensayo 2.	36
Figura 7. Perfil de hidrólisis del bagazo n y p sin pretratamiento.	37
Figura 8. Masa de bagazo <i>in-natura</i> y tamizado inicial y después de cada pretratamiento realizado.	39
Figura 9. Masa del bagazo <i>in-natura</i> y tamizado pretratado antes y después al proceso de hidrólisis.	40
Figura 10. Perfil de hidrólisis del ensayo 5.	40
Figura 11. Perfil de hidrólisis del ensayo 6.	40
Figura 12. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b). Bagazo <i>in-natura</i> .	43
Figura 13. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b). Bagazo tamizado.	43
Figura 14. Masa inicial y final del pretratamiento de bagazo <i>in-natura</i> y masa inicial y final después del proceso de hidrólisis.	47
Figura 15. Perfil de hidrólisis del ensayo 1.	47
Figura 16. Perfil de hidrólisis del ensayo 5.	47
Figura 17. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b).	49
Figura 18. Perfil de hidrólisis en las condiciones óptimas del pretratamiento.	51
Figura 19. Muestras de bagazo antes y después del pretratamiento	52

y después de la hidrólisis en las condiciones optimas.	
Figura 20. Reacción para la cuantificación de azúcares reductores totales por DNS.	57
Figura 21. Curva patrón de glucosa (azúcar reductor).	59
Figura 22. Porcentaje de fracción másica retenida en función del diámetro medio de la partícula.	63
Figura 23. Porcentaje de fracción másica acumulada en función del diámetro medio de la partícula.	62
Figura 24. Bagazo in-natura y tamizado.	63
Figura 25. Gráfico de concentración de enzima en cada dilución en función de la masa de glucosa liberada por 1,0 ml de enzima diluida en condiciones reaccionales predeterminadas.	66
Figura 26. Gráfico de la concentración de la enzima en cada dilución en función de la masa de glucosa liberada por 0,5 ml de la enzima diluida en condiciones reaccionales predeterminadas.	70
Figura 27. Perfil de hidrólisis del ensayo 3.	72
Figura 28. Perfil de hidrólisis del ensayo 4.	72
Figura 29. Perfil de hidrólisis del ensayo 5.	72
Figura 30. Perfil de hidrólisis del ensayo 6.	72
Figura 31. Perfil de hidrólisis del ensayo 7.	72
Figura 32. Perfil de hidrólisis del ensayo 8.	72
Figura 33. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para ART.	73
Figura 34. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para glucosa.	73
Figura 35. Perfil de hidrólisis del ensayo 3.	74
Figura 36. Perfil de hidrólisis del ensayo 4.	74
Figura 37. Perfil de hidrólisis del ensayo 5.	74
Figura 38. Perfil de hidrólisis del ensayo 6.	74
Figura 39. Perfil de hidrólisis del ensayo 7.	74
Figura 40. Perfil de hidrólisis del ensayo 8.	74
Figura 41. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para ART.	75
Figura 42. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para glucosa.	75

Figura 43. Masa inicial y final de pretratamiento de bagazo <i>in-natura</i> , masa inicial y final después del proceso de hidrólisis. Análisis del tiempo reaccional.	77
Figura 44. Perfil de hidrólisis para cada uno de los ensayos – variación del tiempo de pretratamiento.	77
Figura 45. Masa inicial y final del pretratamiento del bagazo <i>in-natura</i> y masa inicial y final después del proceso de hidrólisis. Análisis de la temperatura reaccional.	79
Figura 46. Perfil de hidrólisis para cada uno de los ensayos – variación de la temperatura de pretratamiento.	80

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de los reactivos utilizados en los experimentos.	27
Tabla 2. Rango de valores en el planeamiento factorial 2^3 con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.	34
Tabla 3. Matriz de planeamiento factorial 2^3 con tres puntos centrales.	34
Tabla 4. Matriz de planeamiento con los resultados de masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.	37
Tabla 5. Rango de valores en el planeamiento 2^3 con H_2O_2 .	38
Tabla 6. Valores de las variables en cada uno de los ensayos.	38
Tabla 7. Matriz de planeamiento con los resultados de masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.	41
Tabla 8. Rango de valores en el planeamiento estrella para determinación de las mejores condiciones de pretratamiento.	45
Tabla 9. Valores de las variables en cada uno de los ensayos.	46
Tabla 10. Matriz de planeamiento con los resultados de masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.	48
Tabla 11. Absorvancia de solución de glucosa después de la reacción con DNS.	58
Tabla 12. Porcentaje de humedad del bagazo de caña de azúcar inicialmente.	60
Tabla 13. Porcentaje de humedad de bagazo de caña de azúcar después de 48 h de secado.	60
Tabla 14. Fracción másica retenida y acumulada.	61
Tabla 15. Concentraciones de soluciones de enzima β -glucosidasa.	65
Tabla 16. Valores de absorvancia y masa de glucosa liberada por cada dilución de enzima analizada.	66
Tabla 17. Concentración de soluciones diluidas de la enzima celulasa.	68
Tabla 18. Valores de absorvancia y masa de glucosa liberada por cada dilución de enzima analizada.	70
Tabla 19. Valores de variables en cada uno de los ensayos.	76
Tabla 20. Valores de variables en cada uno de los ensayos.	79

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Determinacion de concentracion de azúcares reductores totales (ART).	57
ANEXO B. Construcccion de curva patron de glucosa para el reactivo DNS.	58
ANEXO C. Humedad del bagazo de caña de azúcar.	60
ANEXO D. Analisis granulometrico del bagazo de caña de azúcar.	61
ANEXO E. Determinacion de actividad de la β -glucosidasa.	64
ANEXO F. Determinacion de la actividad enzimatica de la celulaza.	68
ANEXO G. Perfil de hidrólisis para el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.	72
ANEXO H. Perfil de hidrolisis para el pretratamiento con H_2O_2 .	74
ANEXO I. Estudio del tiempo del preratamiento.	76
ANEXO J. Estudio de la temperatura del pretratamiento.	79
ANEXO K. Método analítico: calorimetría y espectrofotometría.	82

RESUMEN

Título: OPTIMIZACIÓN DEL PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ALCALINO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PARA LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA¹.

Autores: SANDRA MARCELA GOMEZ RUEDA, LAURA LILIANA GARZON FUENTES^{**}.

Palabras claves: biomasa, bagazo de caña, pretratamiento, hidrólisis enzimática, glucosa, pretratamiento con peróxido de hidrógeno en medio alcalino, pretratamiento con hidróxido de calcio.

Descripción:

El proceso de pretratamiento del bagazo de caña fue estudiado efectuando una comparación entre los pretratamientos realizados con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno alcalino. Los análisis fueron efectuados a través de un planeamiento factorial 2^3 , con niveles de confianza del 90%, utilizando tiempo de reacción (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y masa de cal (g) o concentración de peróxido de hidrógeno (%) como variables del proceso. Los resultados en este trabajo muestran que el pretratamiento con hidróxido de calcio presenta un menor efecto en la remoción de hemicelulosa comparado con el peróxido de hidrógeno alcalino. Además de esto, el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino puede ser efectuado en condiciones más suaves de temperatura y en menores tiempos de reacción, llevando a resultados de glucosa ligeramente mayores. Fue observado también que no hay gran influencia del tamaño de la partícula en la liberación de los azúcares fermentables después de la hidrólisis enzimática con bajas cantidades de celulasa y β -glicosidasa: 3,42 FPU/g de biomasa seca y 1,01 CBU/g de biomasa seca, respectivamente. Después de haber seleccionado el mejor pretratamiento (peróxido de hidrógeno alcalino) la optimización fue efectuada a través de un planeamiento estrella analizando dos variables: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y concentración de peróxido de hidrógeno (%). El tiempo fue eliminado del planeamiento una vez que no se mostró estadísticamente significativo en los ensayos preliminares. Los resultados estadísticos del óptimo global mostraron que el tiempo de reacción y la temperatura no son estadísticamente significativos. También se obtuvieron las condiciones óptimas de pretratamiento que fueron: tiempo de 1 h de reacción, temperatura de 25°C con una concentración de 7,855% de peróxido, y los resultados de masa de ART y glucosa después de 48 h de hidrólisis fueron 0,887 g y 0,691 g respectivamente.

* Proyecto de grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Director. PhD. FILHO, Rubens Maciel.

ABSTRACT

Title: OPTIMIZATION OF PRETREATMENT WITH ALKALINE HYDROGEN'S PEROXIDE OF THE SUGAR CANE'S BAGASSE FOR GLUCOSE PRODUCTION*.

Key words: cane's bagasse, pretreatment, calcium's hydroxide, alkaline hydrogen's peroxide, enzymatic hydrolyses

Autors: SANDRA MARCELA GOMEZ RUEDA, LAURA LILIANA GARZON FUENTES**.

Abstract:

The sugar cane's bagasse process of pre- cure was studied carrying out a comparison between the pretreatment made with calcium's hydroxide and alkaline hydrogen's peroxide. The analyses were carry out through a factorial planning 2^3 , with confidence's levels of 90%, using time of reaction (h), Temperature ($^{\circ}\text{C}$), and mass of lime or concentration of hydrogen's peroxide (%) as variable process. The results in this work show that the pre cure with calcium's hydroxide presents a smaller effect in the removal of hemicelluloses compared with alkaline hydrogen's peroxide. In addition, the pretreatment with alkaline hydrogen's peroxide can be carry out in smooth conditions of temperature and smaller times of reaction, taking to slightly greater glucose results. It was observed also is no great influence as large as the particle in the liberation of fermentable sugars after enzymatic hydrolysis with low amounts of cellulose and β -glycosidase: 3.42 FPU/g of dry biomass and 1.01 CBU/g of dry biomass, respectively. After to have selected the best pre -cure (alkaline hydrogen's peroxide) the optimization was carry out through a stars planning analyzing two variables: temperature ($^{\circ}\text{C}$) and concentration of hydrogen's peroxide (%). The time was eliminated of the planning once it was not statistically significant in the preliminary assay. The statistical results of the global optimal showed that the reaction time and the temperature are not statistically significant. Also the optimal conditions of pretreatment were obtained those were: reaction time 1h, temperature 25°C with peroxide's concentration of 7.855%, and the results for ART's and Glucose mass after 48 h of hydrolysis were .887 g and .691 g respectively.

* Project of grade

** Industrial university of Santander. Ability of Physiochemical Engineerings. Director. PhD. FILHO, Rubens Maciel.

INTRODUCCION

Actualmente hay gran interés por parte de la sociedad y de las industrias, en la utilización de recursos renovables. Por este motivo, están siendo cada vez más estudiados métodos que utilizan residuos agrícolas para la obtención de productos químicos de mayor valor agregado como, por ejemplo, etanol combustible, pulpa celulósica y otros derivados de celulosa. Pero a su vez, los excedentes de la industria de caña de azúcar, la paja de trigo y la parte del bagazo que no es quemado para la obtención de energía, constituyen un problema ambiental y al mismo tiempo una fuente renovable de recursos.

La materia prima usada para la producción de etanol es la sacarosa de la caña de azúcar. Muchas investigaciones han sido hechas para viabilizar el uso del bagazo de caña de azúcar hidrolizado como materia prima con el objetivo de bajar los costos de la producción de etanol y viabilizar la producción de mayor cantidad de etanol con menor área plantada.

El uso del bagazo presenta una serie de ventajas: ya viene procesado de las moliendas, está disponible en grandes cantidades y tienen costo mínimo [1].

La biomasa lignocelulósica en general es relativamente resistente para la bioconversión, y el bagazo de caña de azúcar no es la excepción. La utilización de biomasa como una fuente de carbohidratos para productos químicos y combustibles, ha sido severamente atrasada por la baja eficiencia de la población microbiana celulolítica. La lignina en la biomasa lignocelulósica forma una barrera física para el ataque enzimático de la celulosa.

La tasa de la degradación enzimática de la celulosa está relacionada inversamente al índice de lignina. Para que la enzima celulasa catalice la hidrólisis de la celulosa debe existir un contacto directo entre las microfibras de

la celulosa y el complejo enzimático. Entonces, la tasa de hidrólisis enzimática de la celulosa es profundamente afectada por la estructura del material lignocelulósico. Esto ha necesitado un desarrollo de varios tipos de pretratamientos para aumentar la susceptibilidad de la asociación celulosa-lignina para la hidrólisis enzimática.

El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica puede ser clasificado en físicos, químicos y biológicos, y sus combinaciones.

Las rutas mas conocidas para llevar a cabo el proceso de hidrólisis son: la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida de la biomasa es eficiente y relativamente económica, genera residuos poluentes y productos que inhiben la posterior fermentación. La sacarificación enzimática ha sido objeto de la mayor parte de los estudios hoy en el mundo. El proceso enzimático ofrece potencial de reducción de costos a largo plazo, pues es posible alcanzar rendimientos próximos de los estequiométricos en condiciones menos críticas de temperatura, presión y agresividad química, además de ser el proceso menos poluente [2].

Las tecnologías de conversión de la biomasa a etanol se están desarrollando rápidamente y los obstáculos siendo identificados y superados, lo que probablemente posibilitará una comercialización difundida del producto en un futuro próximo.

1. MARCO TEORICO

Las tendencias mundiales para el avance científico y tecnológico en el área de nuevos combustibles destacan la importancia de la utilización de residuos agroindustriales como materia prima en los procesos de producción. La reutilización y reciclaje de estos residuos pueden minimizar los problemas ambientales ligados a su acumulación, y disminuir el uso de combustibles fósiles, además de aprovechar la materia prima. Entre las biomásas lignocelulósicas, el bagazo de caña de azúcar se destaca por ser económicamente viable para la producción de combustibles.

1.1 Caña de azúcar

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, es una gramínea originaria de la India. Las gramíneas constituyen una gran familia de plantas de la clase monocotiledóneas, de hojas envolventes y tallo generalmente hueco [3]. De modo general, el bagazo se compone de fibras y médula, en las proporciones de aproximadamente 65% y 35% respectivamente. Las células que constituyen las fracciones de fibra y de médula son bastante diferentes físicamente. Las fibras poseen una gran razón de longitud/diámetro (cerca de 70) y un elevado coeficiente de expansión y contracción bajo procesos de humedecimiento y secado.

1.2 Composición química de los materiales lignocelulósicos

Todos los materiales lignocelulósicos incluyendo el bagazo de caña de azúcar están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de pequeñas cantidades de otros componentes.

1.2.1 Celulosa

La celulosa es un polímetro lineal (parte amorfo y parte cristalino) formado por moléculas de anhidro-glucosa unidas por ligaciones de tipo β -(1,4) glicosídicas,

de fórmula general ($C_6H_{10}O_5$). La estructura física y morfológica nativa de la celulosa es compleja, y los detalles de la estructura son difícilmente determinados experimentalmente [4].

1.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa, está íntimamente asociada a la celulosa en la pared de la célula vegetal y está compuesta por diferentes unidades de azúcares formando cadenas ramificadas [5]. Estas diferentes unidades de azúcares son compuestas por glucosa, manosa y galactosa (hexosas) además de la xilosa y arabinosa (pentosas). La hemicelulosa se encuentran en el bagazo de caña de azúcar en la proporción de 25 a 27% [6].

1.2.3 Lignina

La lignina, después de la celulosa, es la macromolécula orgánica más abundante dentro de los materiales lignocelulósicos. Es una sustancia que va siendo incorporada durante el crecimiento del vegetal, compuesta básicamente de unidades de fenilpropano que forman una macromolécula tridimensional y amorfa. La lignina representa de 20 a 30% de la masa total del material lignocelulósico.

1.3 Pretratamiento

Los residuos agrícolas requieren un pretratamiento para aumentar la digestibilidad de la biomasa y hacer que la celulosa se torne más asequible a las enzimas que convierten los carbohidratos en azúcares fermentables [7].

El objetivo del pretratamiento es quebrar la barrera de la lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa. Un pretratamiento eficaz es caracterizado por diversos criterios: evitar la necesidad de reducir el tamaño de las partículas de la biomasa, preservar las fracciones de la pentosa (hemicelulosa), limitar la formación de los productos de la degradación que inhiben el crecimiento de los microorganismos fermentativos y minimizar la demanda de energía (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999).

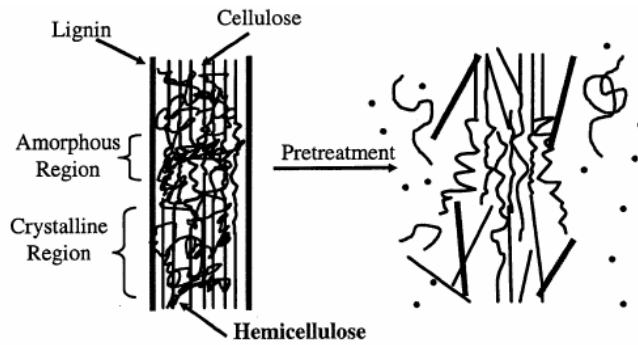


Figura 1: Pretratamiento en los materiales lignocelulósicos [8].

Estas propiedades, junto con otras, incluyendo el bajo costo de los reactivos del pretratamiento, la posibilidad de ser reciclable y la generación de coprodutos de la lignina de alto valor agregado, son una base de comparación para varias opciones de pretratamiento [9].

El pretratamiento resulta en la ampliación del área superficial interna de las partículas del sustrato, realizada a través de la solubilización y/o por la degradación parcial de la hemicelulosa y de la lignina. Esto conduce al fraccionamiento de los tres componentes y lleva a la abertura de la estructura de la celulosa [10].

1.3.1 Tipos de pretratamientos

Existen varios tipos de pretratamiento que pueden ser usados para aumentar la susceptibilidad de la asociación celulosa-lignina para mejorar la hidrólisis enzimática.

1.3.1.1 Pretratamiento químico

Dentro de los varios tipos de pretratamientos químicos destacaremos el básico (hidróxido de calcio) y el oxidante (peróxido de hidrógeno) para objeto del trabajo.

1.3.1.1.1 Pretratamiento con hidróxido de calcio (cal)

Los procesos de pretratamientos con bases utilizan temperaturas y presiones mas bajas comparadas con otras tecnologías de pretratamientos. Al contrario

de los pretratamientos ácidos, ocurre una limitación porque algunas bases son convertidas en sales irrecuperables o incorporadas como sales en la biomasa a través de las reacciones del pretratamiento. El hidróxido de calcio aumenta la digestibilidad de la biomasa significativamente, es de difícil reciclaje, además de ser una base relativamente costosa.

1.3.1.1.2 Pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino

Los pretratamientos oxidativos han sido usados para disolver los componentes de la matriz lignocelulósica y acelerar la hidrólisis enzimática y la biodegradación. La oxidación es utilizada para degradar la lignina y la hidrólisis para liberar los carbohidratos. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino en residuos lignocelulósicos, como el bagazo de caña de azúcar, aumenta enormemente la susceptibilidad para la hidrólisis enzimática y consecuentemente la producción de etanol [11].

1.4 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa es realizada por las enzimas celulazas, las cuales son altamente específicas [12]. El producto de la hidrólisis es usualmente azúcares reductores, incluyendo la glucosa. El costo de la hidrólisis enzimática es muchas veces bajo comparado con la hidrólisis ácida debido a que la hidrólisis enzimática es conducida en condiciones suaves (pH 4,8; y temperatura 45-50°C), además de no presentar problemas de corrosión en los equipos [13].

Esquema hipotético para la degradación de la celulosa en 3 etapas [14]:

1. Celulosa nativa $\xrightarrow{\text{endoglicosidasas}}$ Celulosa activa
2. Celulosa activa $\xrightarrow{\text{exoglucosidasa}}$ Celobiosa
3. Celobiosa $\xrightarrow{\beta\text{-glucosidasa}}$ Glicosa

El rendimiento de la hidrólisis es gobernado por muchos factores, tales como: tipo de pretratamiento del sustrato, inhibición de la actividad enzimática por los productos finales de la biodegradación, termoestabilidad de las enzimas, concentración y absorción del sustrato, tiempo de duración de la hidrólisis, pH del medio, concentración del sustrato en el medio y tasa de agitación.

1.4.1 Enzimas celulasas

La hidrólisis de la celulosa por las celulasas resulta en la producción final de glucosa. Las celulasas, por ser proteínas, no consiguen penetrar con facilidad la barrera de la lignina de las células vegetales y, de esta forma, el difícil acceso de estas enzimas a las fibras de celulosa constituye el principal problema para el desencadenamiento de este proceso de degradación [15]. Luego, la necesidad del pretratamiento antes de la etapa de la hidrólisis es de suma importancia.

1.4.2 Modo de acción de las celulasas: sinergismo

El modo de acción de las celulasas, generalmente es reconocida por la existencia de tres tipos de celulasas en los sistemas completos: endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasa o celobiasa [16].

Las endoglucanasas (EGs) hidrolizan preferiblemente los enlaces internos en el polímero de la celulosa. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs) inician la hidrólisis en las extremidades de la cadena. Las β -glucosidasas completan la hidrólisis catalizando la hidrólisis de la celobiosa a glucosa. Por lo tanto, las celobiasas hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas solubles en agua a la glucosa.

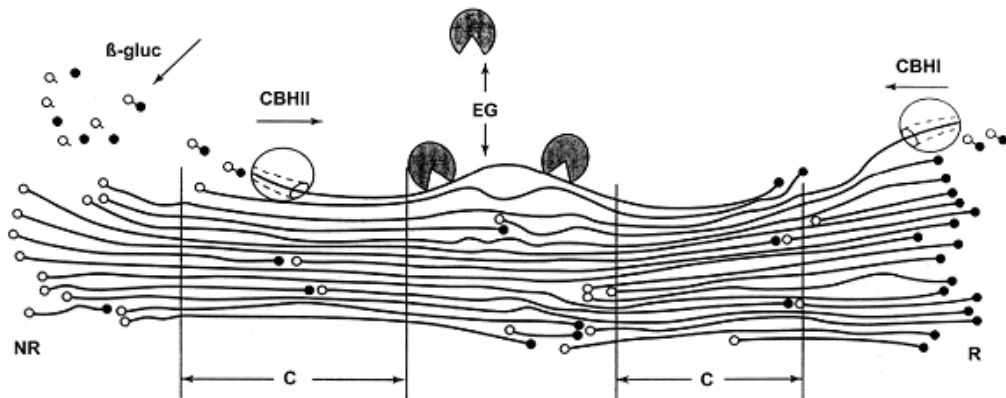


Figura 2: Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa y de la acción del CBHs, EGs, y β -glucosidasas (β -gluc) de *Trichoderma reesei*. **C** define la región altamente ordenada (región cristalina), **R** los grupos terminales reductores (círculos negros), y **NR** los grupos terminales no reductores (círculos sin rellenos). EGs ataca las estructuras mas desordenadas de la celulosa. La acción de la β -glucosidaza produce la glucosa. Modificado de [17].

1.4.3 Principales factores que afectan la hidrólisis enzimática

Los principales factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa son la cantidad y el tamaño del sustrato, la actividad de la celulasa y las condiciones de reacción (temperatura, pH).

1.4.3.1 Sustrato

En niveles bajos de sustrato, un aumento en su concentración da un aumento en el rendimiento y en la tasa de reacción de hidrólisis [18]. Por lo tanto, altas concentraciones de sustrato pueden causar inhibiciones menores que la tasa de hidrólisis. Extensas inhibiciones del sustrato dependen de la razón sustrato/enzima [19]. Otra influencia importante del sustrato en el proceso de pretratamiento e hidrólisis esta relacionada con el tamaño de partícula. Normalmente las investigaciones son realizadas con partículas pequeñas de sustrato, con el objetivo de proporcionar mayor superficie de contacto del material con los reactivos. Además de eso, el tamaño de partícula termina facilitando la penetración de la enzima y del aire dentro de las partículas.

1.4.3.2 Celulasa

Aumentando la dosis de la celulasa durante el proceso, para cierta extensión, se puede aumentar el rendimiento y la razón de la hidrólisis, pero eso significa aumentar los costos de proceso. Luego la optimización de los gastos de la enzima es de fundamental importancia para el proceso.

Las enzimas celulasas pueden ser recuperadas del sobrenadante o de los residuos sólidos.

1.4.3.3 Condiciones reaccionales

La temperatura óptima para la sacarificación utilizando bagazo de caña de azúcar pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino e hidrolizado con celulasa de *T. reesei* QM 9414 (Cellucast) y B-glicosidasa (Novo-188) de *Aspergillus Níger* a una concentración de 10 FPU/g de sustrato y 50 CBU/g de sustrato, respectivamente, fue de 50°C. Las temperaturas de 60°C y 65°C causaron disminuciones drásticas en la tasa de sacarificación. En la escala de 35-50°C, apenas una disminución insignificante en el rendimiento del azúcar fue observado. El rendimiento máximo (70%) fue alcanzado con un pH del hidrolizado de 4,5 [20].

1.5 Planeamiento experimental

El planeamiento experimental tiene la finalidad de ayudar en la preparación y ejecución de experimentos y en el análisis de los resultados, sea a escala laboratorio o a escala industrial. Esta metodología permite obtener un gran número de informaciones con un número reducido de experimentos, minimizando tiempo y costo operacional, además de obtenerse un análisis más racional de los resultados, basado en las probabilidades estadísticas [21].

Con el planeamiento factorial se consigue descubrir como la respuesta depende de los factores (variables envueltas en el sistema), o también, como los factores actúan sobre el sistema, produciendo una determinada respuesta.

En caso donde se quiera estudiar los efectos de los factores sobre una o mas respuestas, podemos utilizar un planeamiento factorial completo 2^n , en donde n es el número de factores estudiados.

En el momento en que el modelo no describe satisfactoriamente la superficie de respuesta, es necesario ampliar el planeamiento. La manera mas común es la construcción del planeamiento compuesto central (también llamado planeamiento estrella), donde se calcula los nuevos valores o puntos axiales. Para el planeamiento factorial 2^2 , los puntos axiales serán -1.41 y +1.41, quedando el planeamiento extendido a una mayor línea.

2. Metodología Experimental

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

Para la realización de los experimentos fue utilizada agua destilada. Los demás reactivos son representados en la tabla 1, que fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

Tabla 1: Características de los reactivos utilizados en los experimentos.

Reactivos	Fórmula Molecular	Fabricante	Masa Molecular (g.mol ⁻¹)	Pureza (% en masa)
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	Ecibra	60,05	99,7
Ácido cítrico monohidratado	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	Dinámica	210,14	99,5
Ácido clorhídrico	HCl	Merck	36,5	37
Ácido dinitro-3,5-salicílico	C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	Vetec	228,12	99
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Synth	98,08	95-98%
D-(+)-glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck	180,16	≥ 99

Fenol	C ₅ H ₆ OH	Vetec	94,11	99
Papel Filtro n° 1	-	Whatman	-	-
Hidróxido de calcio	Ca(OH) ₂	Merck	74,1	≥ 96
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck	39,98	≥ 96
Kit Glucosa GOD-PAP	-	Laborlab	-	-
Meta-bisulfito de sodio	Na ₂ S ₂ O ₅	Ecibra	190,1	97
Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂	Merck	33,98	30
Tartarato de sodio y potasio tetrahidratado	KNaC ₄ H ₄ O ₆ . 4H ₂ O	Synth	282,22	99
β-D-(+)-celobiosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sigma- Aldrich	342,33	≥ 99

2.1.2 Equipos

Los equipos utilizados para la determinación experimental fueron:

- Agitador electromagnético de marca Produtest y tamices redondos patronizados de la serie de Taylor de las marcas granuteste y bertel;
- Balanza analítica de marca Bel Engineering con precisión de ± 0,001 g;
- Balanza de marca Marte con precisión de ± 0,01 g;
- Baño termostatzado modelo MA-184 de marca Marconi con precisión de ± 0,01 °C;
- Centrífuga microprocesada NT 810 de marca Nova técnica;
- Espectrofotómetro 600 S de la línea Fento con precisión en la tercera décima;
- Espectrofotómetro UV Mini-1240 Shimadzu con precisión en la cuarta décima;
- Estufa de secado especial modelo MA-035/2 de marca Marconi;
- Estufa para secado de plantas de marca Blue M. Electric Company;
- Incubadora refrigerada con agitación, modelo MA-832 de marca Marconi con precisión de ± 0,1°C;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 de marca MS Tecnopon, con precisión de 0,01.

2.1.3 Materia prima

Todo el bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) utilizado en los experimentos fue de una misma cosecha y suministrado por la industria São Luiz – Dedini S/A agroindustria de la hacienda São Luiz – Sector A, de la zona rural de la ciudad de Pirassununga, Estado de São Paulo (Brasil).

2.1.4 Preparación del bagazo de caña de azúcar

Antes del almacenamiento, el bagazo fue secado en una estufa a 45°C por 48 h y dejado a temperatura ambiente por más de 24 h, posteriormente fue almacenado en bolsas herméticamente cerradas.

2.1.5 Separación de la muestra

Después del proceso de secado y almacenamiento de la muestra en el congelador, el material fue dividido en dos partes. Una parte fue almacenada sin pulverizar, que fue llamada bagazo natural. La otra parte del material fue pulverizado y analizado granulométricamente. Este segundo material fue llamado bagazo pulverizado. Además de la muestra natural, una muestra pulverizada también fue utilizada como sustrato en los experimentos con el objetivo de analizar la influencia del proceso de tamizado en los resultados de la hidrólisis.

2.1.6 Enzimas

Fueron utilizadas las enzimas celulasa de *Trichoderma reesei* (Celluclast) y B-glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozime-188). Las actividades enzimáticas de las enzimas y el efecto del pH y la temperatura en la actividad fueron determinados experimentalmente.

2.2 Procedimiento experimental

2.2.1 Determinación de la concentración de azúcares reductores totales (ART)

Las concentraciones de ART fueron determinadas de acuerdo con el método de Acido Dinitrosalicílico (DNS) descrito por MILLER (1959).

2.2.1.1 Cuantificación de los ART

Para la cuantificación de los ART, se adicionó 0.5 mL de las muestras en cada tubo de ensayo y 0.5 mL de DNS. Los tubos fueron mantenidos en un baño a 95°C por 5 minutos para el desarrollo de la coloración rojiza. Después de este tiempo reaccional, las muestras fueron enfriadas inmediatamente por la inmersión de los tubos en un baño con hielo, adicionando enseguida 3.5 mL de solución estabilizante de Tartarato de Sodio y Potasio tetrahidratado. Los tubos fueron agitados para homogenizar la solución y las lecturas de absorbancia efectuadas en el espectrofotómetro. Para calibrar el espectrofotómetro, se preparo un tubo donde un volumen de la muestra fue sustituido por agua destilada, el cual fue llamado tubo blanco de reacción.

2.2.2 Determinación de la concentración de glucosa

La concentración de glucosa fue determinada de acuerdo al método enzimático GOD-PAP, descrito por Henry (1974). Se trata de un kit enzimático que contiene un monoreactivo listo para ser usado, además de una solución patrón de glucosa con una concentración de 100 mg/dL.

2.2.2.1 Cuantificación de glucosa

Para la cuantificación de glucosa se adicionaron 10 µL de cada una de las muestras en tubos de ensayo previamente identificados y 1 mL de monoreactivo. Los tubos fueron mantenidos en un baño termostático a 37 °C por 10 minutos para el desarrollo de la coloración rosada. Al terminar la reacción los tubos fueron retirados y se adicionó en cada uno de ellos 3 mL de agua destilada. Los tubos fueron invertidos para homogenizar la solución y así,

efectuar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro. Los tubos del blanco de la reacción y del patrón de glucosa fueron hechos juntamente con los tubos de las muestras. Para el tubo del blanco se adicionó 1mL de reactivo enzimático y para el tubo patrón se adicionó 10 µL de la solución patrón de glucosa (100mg/dL) y 1 mL de monoreactivo enzimático.

2.2.3 Determinación de la actividad de las enzimas

Para la determinación de la actividad enzimática se prepararon soluciones con varias concentraciones de las enzimas en tampón de citrato 0.05 mol/L pH 4,8.

2.2.3.1 Determinación de la actividad de la celulasa

Para la enzima celulasa, la actividad fue determinada como actividad de papel filtro (FPA) y se expresó como unidades de papel filtro (FPU-“Filter Paper Units) por volumen de enzima original como lo recomienda la IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD y BHAT, 1988; ADNEY y BAKER, 1996).

2.2.3.2 Determinación de la actividad de β-glucosidasa

Para la β-glicosidasa la medida de la actividad fue determinada a través de una solución de celobiosa 15 mmol/L y se expresó en unidades de celobiosa (CBU) por volumen de enzima original, como lo recomienda la IUPAC (WOOD e BHAT, 1988).

2.2.4 Planeamiento experimental de los pretratamientos

Para el hidróxido de calcio, se inició un planeamiento factorial donde fueron estudiadas 3 variables del proceso: tiempo de contacto (h), temperatura (°C) y masa de Ca(OH)₂ (g/g de biomasa seca). En el planeamiento factorial experimental del H₂O₂ alcalino, tres variables del proceso también fueron analizadas: tiempo de contacto (h), temperatura (°C) y concentración de H₂O₂ %v/v. El pH de la solución con la concentración predeterminada en el planeamiento con peróxido de hidrógeno fue ajustado a 11.5 con hidróxido de sodio.

2.2.4.1 Reacciones del pretratamiento

Las muestras de aproximadamente 4,0 g de bagazo natural (N) y tamizado (P) fueron tratadas con 100 mL de la solución conteniendo los reactivos a ser estudiados ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_2O_2 alcalino) a una concentración predeterminada por el planeamiento e inmediatamente llevados a una incubadora donde eran mantenidos a una rotación de 150 rpm con temperatura y tiempo reaccional predeterminados también por el planeamiento experimental.

Al terminar cada una de las reacciones, el líquido reaccional era descartado y los residuos restantes lavados con agua destilada y centrifugados hasta que toda la coloración desapareciese (aproximadamente 12 lavadas). Las muestras fueron entonces llevadas a la estufa, secas a una temperatura de 110 °C, pesadas en una balanza analítica y almacenadas en el refrigerador en potes plásticos identificados, estando así listos para la etapa de hidrólisis enzimática.

2.2.4.2 Hidrólisis del bagazo pretratado

Para la verificación de cual fue el mejor pretratamiento y que parámetro estudiado interfiere en el pretratamiento, fueron realizadas hidrólisis para cada una de las muestras en las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima para obtener la cuantificación de los ART y de glucosa. Para investigar las condiciones de pretratamiento y verificar cuales variables de proceso tienen influencia en esta etapa, fueron recogidas muestras de la hidrólisis enzimática (aproximadamente 2 mL) en periodos de tiempo predeterminado, tales como 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h y luego hervidas por 15 minutos en tubos identificados, para la inactivación de las enzimas.

Se utilizó concentraciones de celulasa y β -glucosidasa bajas: 3,42 FPU/g de biomasa seca y 1,01 CBU/g de biomasa seca, respectivamente.

Al final de las 72 h de hidrólisis y después de ser recogido el líquido reaccional en este tiempo, los residuos restantes fueron lavados con agua destilada y centrifugados hasta que todo el azúcar fuese retirado del residuo

(aproximadamente 6 lavadas). Las muestras fueron llevadas a la estufa, secas a una temperatura de 110°C, pesadas en una balanza analítica y almacenadas en el congelador en potes plásticos previamente identificados.

2.2.4.3 Cuantificación de los ART y glucosa

Después de la cuantificación de los azúcares reductores totales, se trazó un perfil de la hidrólisis en cada ensayo donde la masa de ART y glucosa liberada en el medio reaccional fueron analizadas en función del tiempo de hidrólisis.

2.2.4.4 Análisis de los resultados a través de STATISTICA 7.0

Después del análisis de los perfiles de hidrólisis para cada ensayo, fueron determinados los puntos de estabilización para cada reacción, o sea, puntos donde las masas de ART y de glucosa liberadas en el medio reaccional permanecieron inalteradas en relación al tiempo.

La masa de ART y glucosa fueron entonces utilizadas para análisis, juntamente con los datos del planeamiento experimental factorial de los pretratamientos utilizando el programa computacional STATISTICA 7.0.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 Calculo de la humedad teórica del bagazo de caña de azúcar

Antes de iniciar los experimentos, el bagazo fue seco y analizado en relación a la humedad teórica. La humedad teórica de la muestra sin ningún proceso de secado mostró un porcentaje del 60.20%. Después de 48 h de secado, la humedad teórica encontrada fue de 4.87 % (ver anexo c). El principal objetivo en el secado del material es minimizar la proliferación de microorganismos que puedan degradar o fermentar el material.

3.2 Planeamiento experimental de los pretratamientos

3.2.1 Planeamiento factorial 2^3 del pretratamiento con hidróxido de calcio.

Se inició un planeamiento factorial donde fueron estudiadas tres variables del proceso: Tiempo de contacto (h), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Masa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (g/g de masa seca). Fueron realizados análisis para la muestra de bagazo natural (*in-natura*) (N) y tamizado (P). Se presentan en la tabla 2 los valores de los niveles de cada una de las variables en los experimentos.

Tabla 2. Rango de valores en el planeamiento factorial 2^3 con $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Tiempo de contacto (h)	12	24	36
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	60	65	70
Masa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (g/g biomasa seca)	0,10	0,25	0,40

La metodología experimental del pretratamiento se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.2.4.1.

Tabla 3. Matriz de planeamiento factorial 2^3 con tres puntos centrales.

Ensayo	Substrato	Tempo (h)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Masa de Cal (g/g biomasa seca)
1	N e P	12	60	0,10
2	N e P	36	60	0,10
3	N e P	12	70	0,10
4	N e P	36	70	0,10
5	N e P	12	60	0,40
6	N e P	36	60	0,40
7	N e P	12	70	0,40

8	N e P	36	70	0,40
9	N e P	24	65	0,25
10	N e P	24	65	0,25
11	N e P	24	65	0,25

En la figura 3 se observa que hubo una disminución muy pequeña en casi todos los ensayos de masa de bagazo (una pérdida de aproximadamente 1 g de biomasa). Hubo una disminución mas acentuada de la masa del bagazo tamizado con excepción de los ensayos 5,6 y 7, en que la mayor pérdida de la masa ocurre en la muestra de bagazo *in-natura*. El ensayo 7 fue el que presentó una mayor pérdida de masa.

Al analizar la figura 4 se puede percibir que en todos los ensayos, el bagazo tamizado presento mayor pérdida de masa que el bagazo natural, lo que significa que el bagazo tamizado proporciono rendimientos mayores de azucares durante la hidrólisis al ser comparado con el bagazo *in-natura*. Para el bagazo *in-natura* el mejor pretratamiento fue realizado en los niveles +1 (36h, 70 °C y 0.4g de cal/g biomasa seca) ya que la masa restante después de la hidrólisis fue menor (ensayo 8). Ya para el bagazo tamizado, el ensayo 4 presento la menor masa restante después de la hidrólisis.

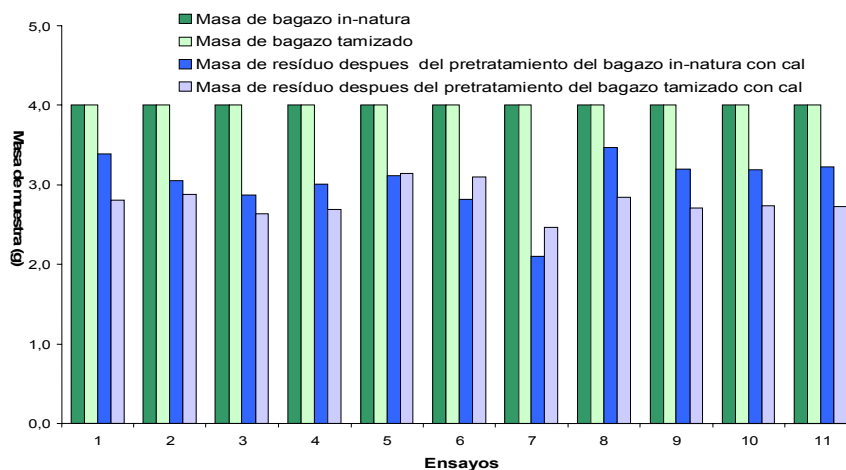


Figura 3. Masa de bagazo *in-natura* y tamizado antes y después del pretratamiento

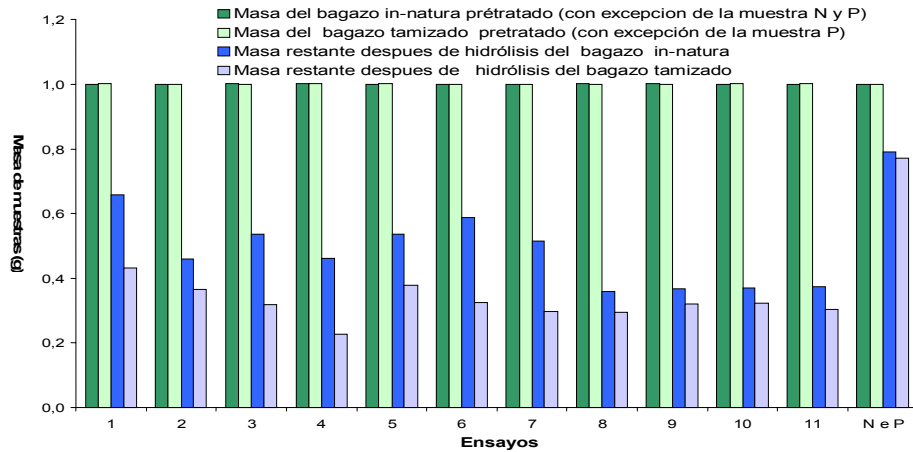


Figura 4. Masa de bagazo *in-natura* y tamizado, con y sin pretratamiento antes y después del proceso de hidrólisis.

En todos los ensayo fueron analizadas las masas de ART y glucosa liberadas en función del tiempo de hidrólisis. Las figuras 5 y 6 muestran los perfiles de hidrólisis de los dos primeros ensayos para bagazo *in-natura* y tamizado, los demás perfiles se encuentran reportados en el anexo G.

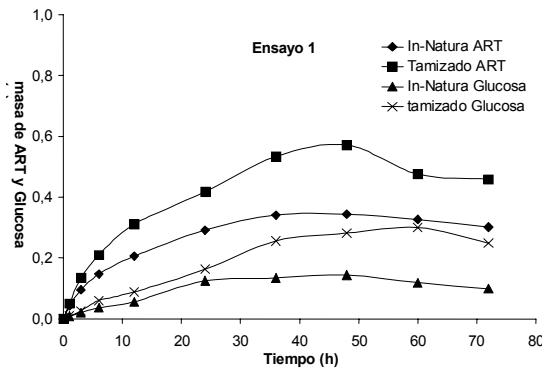


Figura 5. Perfil de hidrólisis del ensayo 1.

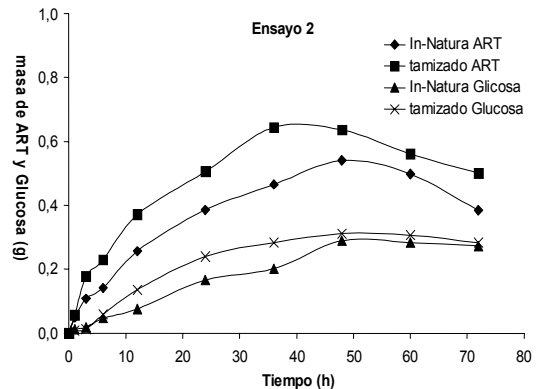


Figura 6. Perfil de hidrólisis del ensayo 2.

Al analizar las figuras 5 y 6 se observa una baja masa de glucosa liberada y una masa de ART bastante considerable. Se nota que en todos los ensayos, los resultados de ART en la hidrólisis fueron mayores para las muestras de bagazo tamizado al ser comparado con las muestras *in-natura*, como ya había sido concluido por el análisis de la figura 4. Lo mismo se ve para la masa de

glucosa, con excepción del ensayo 8, donde la masa de glucosa proveniente del bagazo in-natura es mayor que la del bagazo pulverizado. (Ver anexo G)

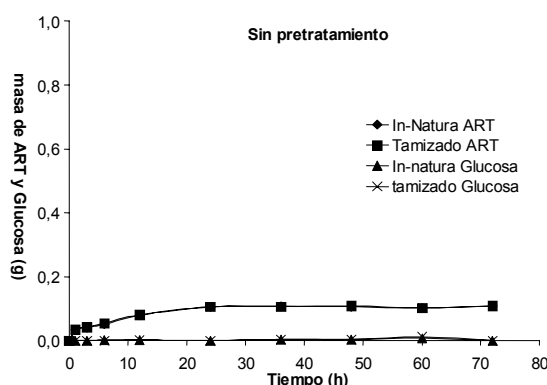


Figura 7 Perfil de hidrólisis del bagazo N y P sin pretratamiento.

En la figura 7 se observa que la cantidad de glucosa liberada en los bagazos in-natura y tamizado sin pretratamiento es prácticamente cero, pero hay liberación de una pequeña cantidad de ART. Esto se debe a que las enzimas no logran llegar a la celulosa debido a la barrera de lignina que no fue quebrada por la ausencia de pretratamiento.

La tabla 4 muestra la masa de ART y glucosa liberada experimentalmente en cada combinación de niveles, siendo los ensayos 9,10 y 11 repeticiones del punto central. Son puestos en negrita los mejores resultados obtenidos en los ensayos para cada respuesta considerada.

Tabla 4. Matriz de planeamiento con los resultados de masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.

Ensayo	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Masa de	Masa	Masa	Masa	
			Ca(OH) ₂ /masa de biomasa seca (g/g)	ART-N (g)	ART-P (g)	Glucosa-N (g)	Glucosa-P (g)
1	-1	-1	-1	0,344	0,572	0,144	0,282
2	1	-1	-1	0,540	0,636	0,289	0,311
3	-1	1	-1	0,465	0,684	0,213	0,474

4	1	1	-1	0,540	0,776	0,288	0,474
5	-1	-1	1	0,463	0,625	0,132	0,257
6	1	-1	1	0,414	0,676	0,143	0,407
7	-1	1	1	0,486	0,704	0,199	0,274
8	1	1	1	0,644	0,707	0,345	0,230
9	0	0	0	0,635	0,679	0,267	0,373
10	0	0	0	0,631	0,681	0,254	0,369
11	0	0	0	0,626	0,699	0,263	0,363

3.2.2 Planeamiento factorial del pretratamiento con H₂O₂

Para el peróxido de hidrogeno, se inicio un planeamiento factorial donde fueron estudiadas 3 variables del proceso: tiempo de contacto (h), temperatura (°C) y concentración de H₂O₂ (%). Fueron realizados análisis para las muestras de bagazo *in-natura* (N) y Tamizadas (P).

Seguidamente se llevo a cabo la metodología experimental para la hidrólisis como se describe en la sección 2.2.4.1.

Tabla 5. Rango de valores en el planeamiento experimental 2³ con H₂O₂

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Tiempo reaccional (h)	6	15	24
Temperatura (°C)	20	40	60
Concentración de H ₂ O ₂ (%)	1	3	5

Tabla 6. Valores de variables en cada uno de los ensayos

Ensayo	Substrato	Tiempo(h)	Temperatura(°C)	[H ₂ O ₂] %
1	N y P	6	20	1
2	N y P	24	20	1
3	N y P	6	60	1
4	N y P	24	60	1
5	N y P	6	20	5

6	N y P	24	20	5
7	N y P	6	60	5
8	N y P	24	60	5
9	N y P	15	40	3
10	N y P	15	40	3
11	N y P	15	40	3

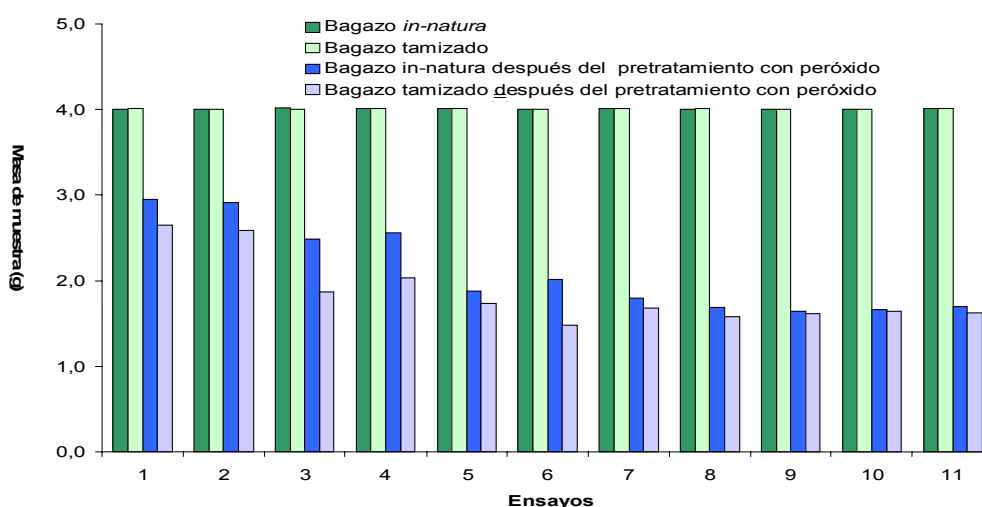


Figura 8 Masa de bagazo *in-natura* y tamizado inicial y después de cada pretratamiento realizado.

Al analizar la Figura 8 se observa una disminución bastante acentuada de la masa del bagazo de caña a partir del 5 ensayo, donde las concentraciones de H_2O_2 son aumentadas considerablemente. El bagazo tamizado presentó una pérdida de masa mayor que el bagazo *in-natura*. En los ensayos donde la concentración de H_2O_2 es mayor, la pérdida de masa se dio, en algunos casos, en más de 50%. Así, el H_2O_2 alcalino presenta grandes efectos en la solubilización de lignina y en la disminución del peso seco, principalmente debido a la solubilización de la hemicelulosa. La metodología experimental para la realización de la hidrólisis se siguió según la sección 2.2.4.2.

Al analizar la masa restante después del proceso de hidrólisis (Figura 9), se puede observar que la mayor pérdida de masa se dio en las muestras

tamizadas, con excepción de los ensayos 7 y 8, donde la pérdida de masa del bagazo *in-natura* fue mayor. En todos los ensayos fueron analizadas las masas de ART y glucosa liberadas en función del tiempo de hidrólisis.

Las Figuras 10 y 11 muestran los perfiles de hidrólisis para los mejores resultados de glucosa y ART respectivamente, los demás perfiles se encuentran reportados en el anexo H. La metodología experimental para la cuantificación de los azúcares liberados en el medio reaccional se siguió como se describe en la sección 2.2.4.3.

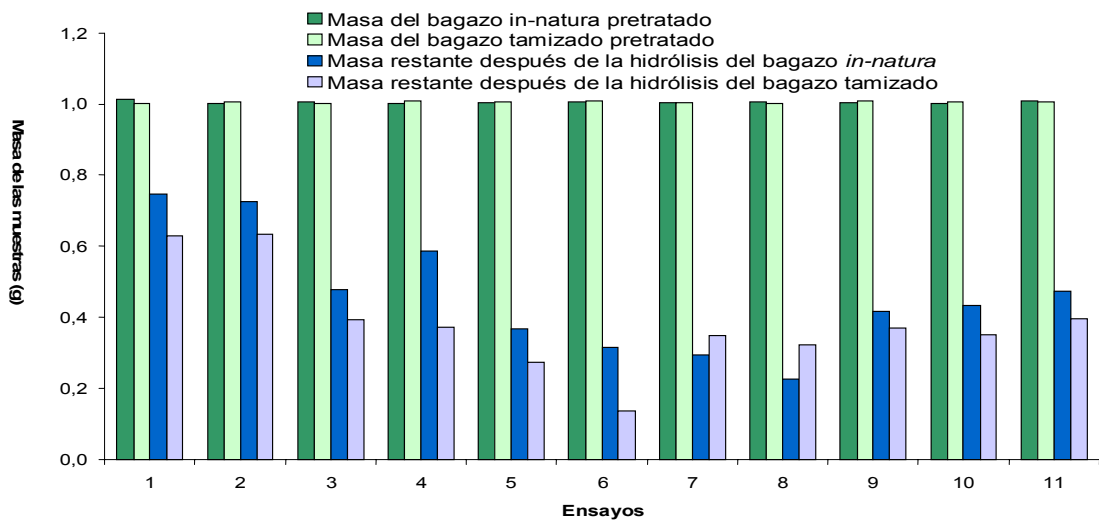


Figura 9: Masa del bagazo *in-natura* y tamizado pretratado antes y después al proceso de hidrólisis.

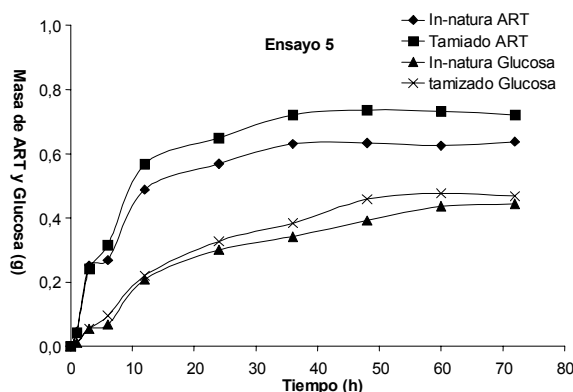


Figura 10 Perfil de hidrólisis del ensayo

5.

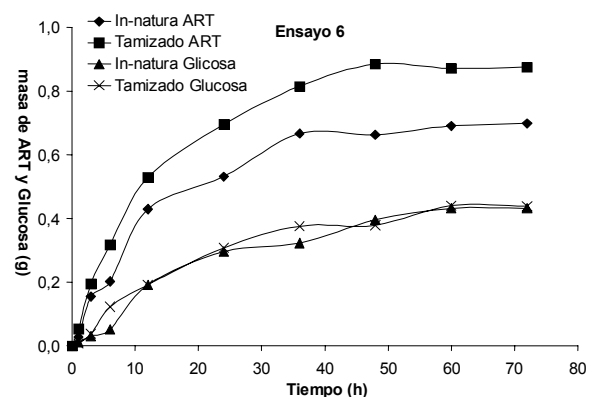


Figura 11 Perfil de hidrólisis del ensayo

6.

Analizando las Figuras 10 y 11 se observa que la masa de glucosa liberada está directamente relacionada con la concentración de H₂O₂ ya que cuanto mayor es la concentración, mayor es la masa de glucosa liberada. La masa de ART se mostró bastante considerable indicando que aún sobro gran cantidad de hemicelulosa en el residuo pretratado.

Se observa en la mayoría de los ensayos, que los resultados de hidrólisis fueron mayores para las muestras de bagazo tamizado comparado con las muestras *in-natura*. En los ensayos 7 y 8 mostrados en el anexo I, se observa una inversión de este resultado donde la masa de glucosa proveniente del bagazo *in-natura* es mayor que el bagazo tamizado. Si comparamos estos resultados de hidrólisis del bagazo pretratado con H₂O₂, con los resultados obtenidos por la hidrólisis del bagazo pretratado con cal, podemos percibir que la diferencia entre la masa de ART y glucosa cuantificada en el bagazo pretratado con H₂O₂ alcalino es menor que la del bagazo pretratado con cal, indicando así una mayor eficiencia del pretratamiento con H₂O₂ visto que hay una menor cantidad de hemicelulosa restante después de este pretratamiento.

3.2.3 Determinación de los efectos principales e interacción de variables

Después del análisis de los perfiles de hidrólisis para cada ensayo, valores de masa de ART y glucosa fueron seleccionados para el análisis estadístico. El punto escogido fue donde se estabilizo la reacción, o sea, el valor donde la masa de los azúcares permaneció prácticamente inalterada. El tiempo de estabilización de la reacción fue diferente para diferentes ensayos, estando entre 48 y 60 h de hidrólisis.

Tabla 7. Matriz de planeamiento con los resultados de masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.

Ensayos	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	[H ₂ O ₂] (%)	Masa ART-N (g)	Masa ART-P (g)	Masa Glucosa-N (g)	Masa Glucosa-P (g)
1	-1	-1	-1	0,265	0,371	0,083	0,148

2	1	-1	-1	0,276	0,372	0,104	0,144
3	-1	1	-1	0,529	0,608	0,263	0,296
4	1	1	-1	0,416	0,636	0,180	0,340
5	-1	-1	1	0,637	0,732	0,444	0,476
6	1	-1	1	0,691	0,872	0,432	0,440
7	-1	1	1	0,711	0,655	0,492	0,428
8	1	1	1	0,781	0,678	0,552	0,388
9	0	0	0	0,588	0,639	0,376	0,346
10	0	0	0	0,569	0,655	0,368	0,369
11	0	0	0	0,535	0,611	0,338	0,328

El análisis de los efectos principales y de interacción de las variables fue realizada utilizando el software STATISTICA 7.0.

3.2.3.1 Análisis de masa de glucosa – bagazo in-natura

La superficie de respuesta y curva de nivel, considerando apenas los efectos significativos, son mostrados en la Figura 12. Estas figuras fueron trazadas manteniendo el tiempo en el punto central.

De acuerdo con la Figura 12, el máximo de masa de glucosa obtenida para el bagazo in-natura se encuentra en la extremidad máxima del intervalo estudiado de temperatura y concentración de peróxido de hidrogeno, lo que sugiere que para obtener el valor del optimo global, se debe entonces trabajar con el aumento de la concentración de H_2O_2 y aumento de la temperatura del pretratamiento. Así que, esto lleva a realizar mas ensayos debido a que el punto máximo aun no se encuentra definido. Como el tiempo no se mostró significativo, se pudo trabajar con los menores valores, minimizando así el tiempo de pretratamiento. Se observa que la temperatura no presenta un efecto tan significativo comparado con el efecto de la concentración ya que a temperaturas bajas y altas concentraciones de H_2O_2 , se consigue obtener una masa considerable de glucosa.

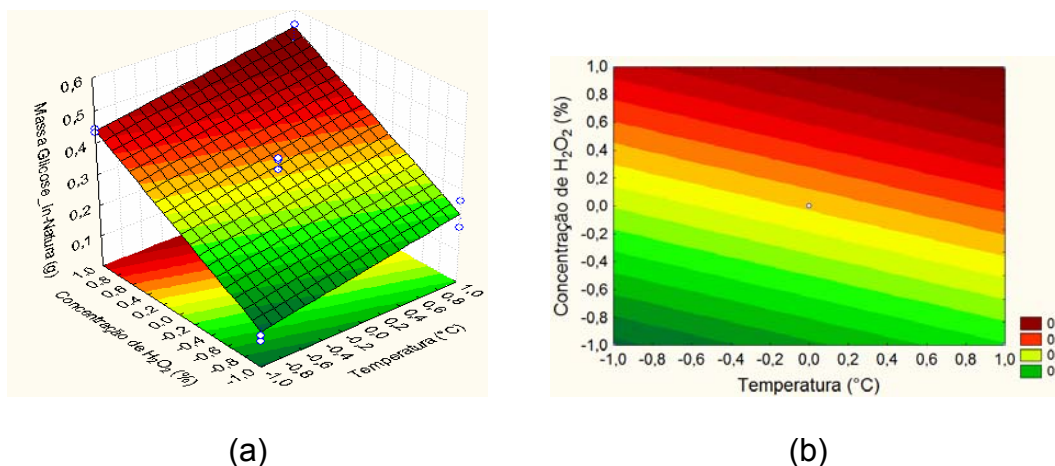


Figura 12. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b). Bagazo in-natura

3.2.3.2 Análisis de masa de glucosa – bagazo Tamizado

La superficie de respuesta y la curva de nivel, considerando apenas los efectos significativos, son mostradas en la Figura . Estas figuras fueron trazadas manteniendo el tiempo en el punto central.

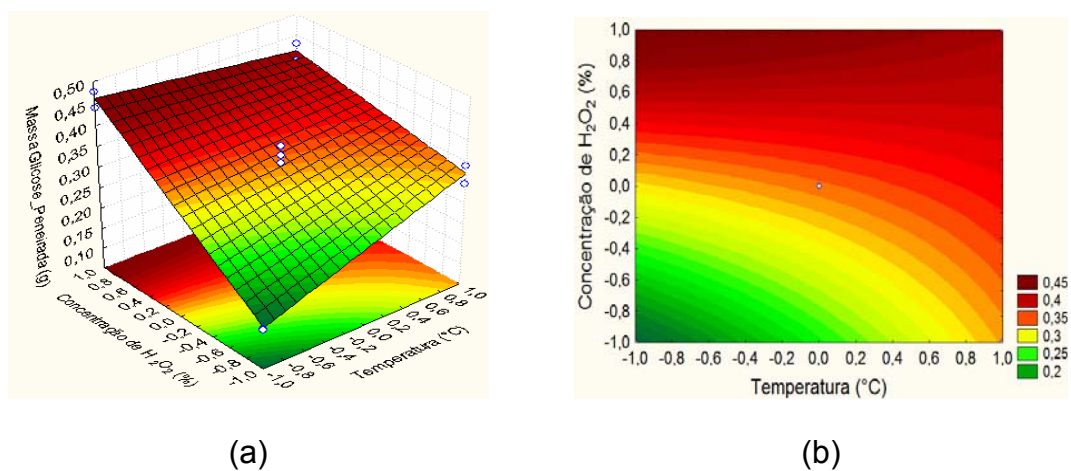


Figura 13. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b). Bagazo tamizado

De acuerdo con la Figura 13, el máximo de masa de glucosa obtenida para el bagazo tamizado se encuentra en la extremidad máxima del intervalo estudiado de concentración de peróxido de hidrogeno y mínimo de temperatura, el que sugiere que para obtener el valor del optimo global, se debe entonces trabajar con el aumento de la concentración de H_2O_2 y disminución de temperatura del pretratamiento. Así, se debe hacer nuevos ensayos ya que el punto máximo

aun no fue definido. Como el tiempo no se mostró significativo, podremos trabajar con los menores valores, minimizando así el tiempo de pretratamiento.

3.3 Optimización del mejor pretratamiento

El pretratamiento con hidróxido de calcio presento una menor masa de glucosa liberada comparada con el pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino. El mejor resultado para el bagazo *in-natura* fue de 0,345 g de glucosa para el ensayo 8 (36 h, 70°C y 0,40 g de cal/g biomasa seca) y para el bagazo tamizado fue de 0,474 g en el ensayo 4 (36 h, 70°C e 0,10 g de cal/g biomasa seca). El pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino llegó a rendimientos de glucosa mayores para el bagazo *in-natura* 0,552 g en ensayo 8 (24 h, 60°C, 5% H₂O₂) y el bagazo tamizado presentó como mejor resultado la liberación de 0,476 g de glucosa en el ensayo 5 (6 h, 20°C, 5% H₂O₂).

Así, además de presentar una baja liberación de glucosa comparado con el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino, el pretratamiento con hidróxido de calcio será dejado de lado en este trabajo y realizado en un próximo estudio, ya que para la optimización del proceso se necesitaría de trabajar en condiciones extremas de temperatura y los equipos utilizados para el desarrollo del trabajo no propicia tal aumento, visto que la temperatura máxima es de 70 °C. La optimización del pretratamiento fue efectuado con el peróxido de hidrogeno alcalino ya que este mostró mejores rendimientos de glucosa y trabaja con condiciones mas suaves de temperatura.

Después de seleccionado el reactivo del pretratamiento, el tipo de bagazo (*in-natura* o tamizado) también fue analizado. Analizando las superficies de respuesta de masa de glucosa liberada por el bagazo *in-natura* (Figura 12) y tamizado (Figura 13) después del pretratamiento con H₂O₂ se percibe que en ambos estudios necesitaríamos aumentar la concentración del reactivo en el pretratamiento. Luego el reactivo fue descartado en la toma de decisión del bagazo a ser usado.

Analizando la Tabla 7 se observa, que en condiciones de baja concentración del reactivo, la masa de glucosa liberada durante la hidrólisis del bagazo tamizado es ligeramente mayor que la masa liberada por el bagazo *in-natura*. A medida que la concentración de H_2O_2 aumenta, los resultados se invierten, habiendo una mayor masa de glucosa liberada por el bagazo *in-natura* comparado con el tamizado. En todos los ensayos, la mayor masa de glucosa liberada fue conseguida en el ensayo 8 con el bagazo *in-natura*, arrojando un resultado de glucosa de 0,552 g.

Otro factor importante está en que utilizando el bagazo *in-natura* conseguimos un mayor aprovechamiento de la materia prima como un todo, ya que gran parte del material (85,59%) fue despreciado cuando el bagazo se sometió al proceso de tamizado. Por el análisis realizado anteriormente fue seleccionado para el proceso de optimización el bagazo de caña de azúcar *in-natura*. Para la optimización del pretratamiento, la variable “tiempo” fue eliminada del planeamiento ya que su efecto no se mostró estadísticamente significativo durante los primeros ensayos. Como los experimentos anteriores habían sido realizados con tiempos de 6, 15 y 24 h de pretratamiento, el tiempo de 6 h fue fijado para todos los ensayos del proceso de optimización variando así apenas la concentración de H_2O_2 y la temperatura.

3.3.1 Planeamiento estrella del pretratamiento

Para la optimización del proceso, se realizó un planeamiento estrella ya que este método estadístico barre una área mayor de respuesta. El planeamiento estudio las 2 variables del proceso: temperatura ($^{\circ}C$) y concentración de H_2O_2 (%). El tiempo fue fijado en 6 h.

Tabla 8. Rango de valores en el planeamiento estrella para determinación de las mejores condiciones de pretratamiento.

Factores	Niveles				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	50	53	60	67	70
Concentración de H ₂ O ₂ (%)	4,17	5	7	9	9,83

Con valores de la tabla 8 se sigue la metodología experimental para la hidrólisis acompañada de la sección 3.2.4.1

Tabla 9. Valores de las variables en cada uno de los ensayos.

Ensayo	Substrato	Temperatura(°C)	[H ₂ O ₂] %
1	N	53	5
2	N	53	9
3	N	67	5
4	N	67	9
5	N	50	7
6	N	70	7
7	N	60	4,17
8	N	60	9,83
9	N	60	7
10	N	60	7
11	N	60	7

Para a liberación de los ART y glucosa, se efectuó la hidrólisis con las siguientes condiciones reaccionales fijas: 1 g de biomasa pretratada en cada combinación de niveles, volumen reaccional de 300 mL, 3,42 FPU de celulaza/g biomasa seca pretratada, 1,01 CBU de β -glucosidasa/g biomasa seca pretratada, pH 4,8, temperatura de 50°C y 100 rpm. La metodología

experimental para la realización de la hidrólisis esta descrita en la sección 3.2.4.2.

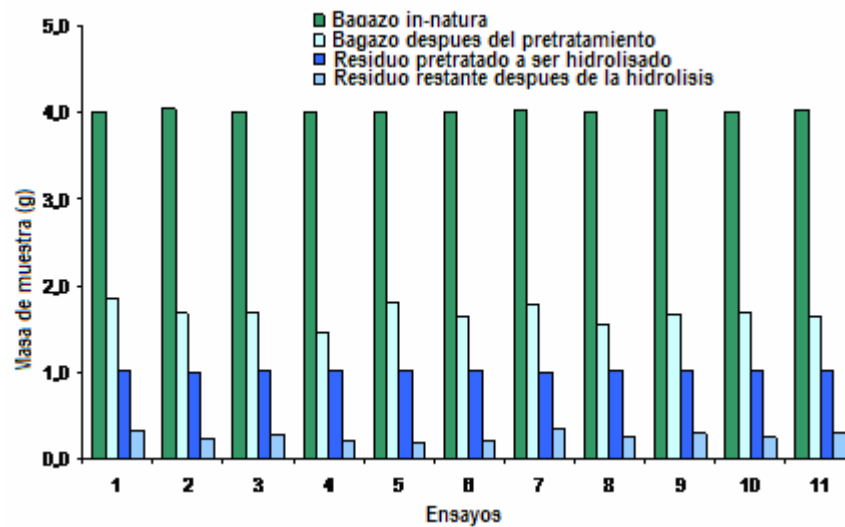


Figura 14. Masa inicial y final del pretratamiento de bagazo *in-natura* y masa inicial y final después del proceso de hidrólisis.

Al analizar la Figura 14 se puede observar que en todos los ensayos hubo una pérdida de masa después al pretratamiento de más del 50%. El ensayo 4 presento la mayor perdida de masa durante el pretratamiento, aproximadamente 64% del bagazo, y el ensayo 1 la menor perdida, aproximadamente 54%. Esto lleva a entender que hubo una perdida considerable de hemicelulosa. En relación a la hidrólisis, la masa restante después al proceso presento menor masa en el ensayo 5, o sea fue el experimento en que ocurrió mayor hidrólisis, aproximadamente el 83% de la masa fue hidrolizada. El peor resultado fue encontrado en el ensayo 7, donde 65% de la masa fue hidrolizado.

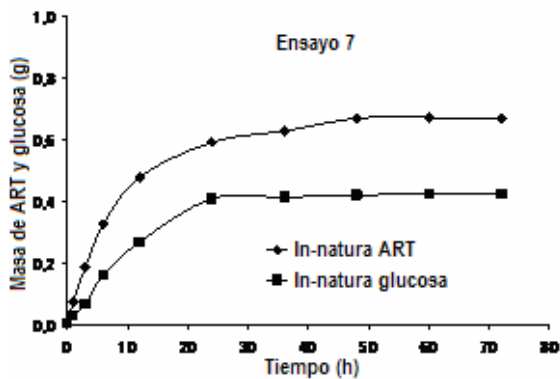


Figura 15. Perfil de hidrólisis del ensayo 7

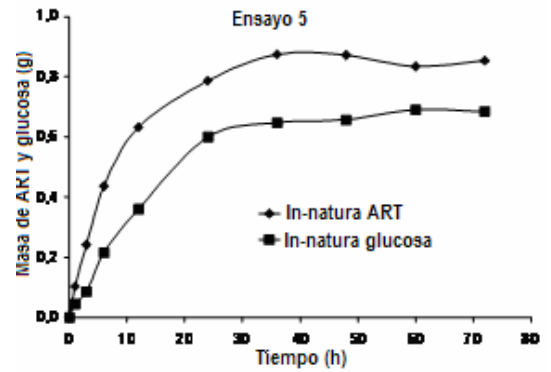


Figura 16. Perfil de hidrólisis del ensayo 5

Al analizar las Figuras 15 y 16 se observa que la diferencia entre el perfil de ART y glucosa disminuyó comparada con el proceso de hidrólisis anteriores llevando así a asegurar que con el aumento de concentración de H_2O_2 , hubo una mayor degradación de la hemicelulosa durante el pretratamiento.

3.3.2 Determinación de los efectos principales e interacción de las variables

Posteriormente se analizó los perfiles de la hidrólisis de los ensayos en que se obtuvieron mayor cantidad y menor cantidad de glucosa. En todos los ensayos fueron analizadas la masa de ART y glucosa liberada en función del tiempo de hidrólisis. La metodología experimental para la cuantificación de los azúcares liberados fue seguida según la sección 2.2.4.3.

Después del análisis de los perfiles de hidrólisis para los ensayos, las masas de ART y glucosa liberadas en el medio reaccional fueron utilizadas para el análisis estadístico. El punto escogido fue donde se detuvo la reacción. El tiempo de estabilización de la reacción fue el mismo para todos los ensayos: 48 h de hidrólisis como se muestra en la figuras 15 y 16.

Tabla 10. Matriz de planeamiento con los resultados de la masa de ART y glucosa liberadas en cada uno de los ensayos.

Ensayos	Temperatura(°C)	[H ₂ O ₂] %	Masa ART-N (g)	MasaGlucosa-N(g)
1	-1	-1	0,685	0,496
2	-1	1	0,772	0,603
3	1	-1	0,736	0,590
4	1	1	0,801	0,688
5	-1,41	0	0,834	0,690
6	1,41	0	0,808	0,649
7	0	-1,41	0,650	0,418
8	0	1,41	0,754	0,623
9	0	0	0,736	0,674
10	0	0	0,765	0,681
11	0	0	0,707	0,634

El análisis de los efectos principales y de interacción de las variables fue realizado utilizando el software STATISTICA 7.0.

3.3.3. Análisis de masa de glucosa

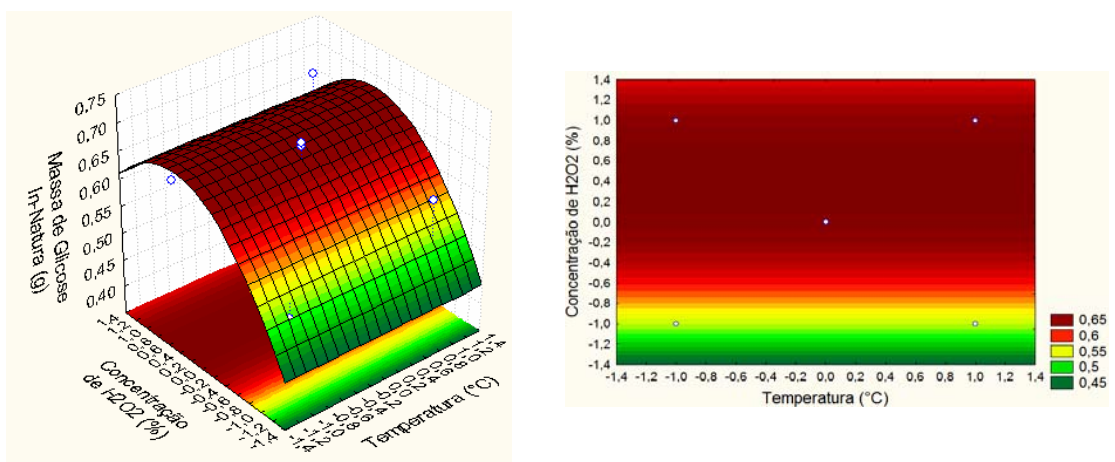


Figura 17. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b)

Podemos observar al analizar la Figura 17 una curva nítida de maximización. Se observa que la temperatura en esas condiciones de hidrólisis no se presenta como un efecto significativo.

Como se pretende maximizar la masa de glucosa liberada durante la hidrólisis, se trabaja en el punto óptimo de concentración de H₂O₂ o sea trabajar con bajas temperaturas ya que esta no se mostró significativa.

Aplicando la derivada en la Ecuación 1 la cual nos brinda el programa estadística tenemos:

$$y = 0,665955 + 0,061864C - 0,072387C^2 \quad (1)$$

$$dy/dC = 0,061864 - 2 \times 0,072387C$$

La derivada dy/dC en el punto máximo es igual a cero por lo tanto tenemos:

$$0 = 0,061864 - 0,144774C$$

$$C = 0,427314$$

Donde C es la concentración máxima de peróxido. Así, el valor de la concentración en el punto óptimo es de 0,427314 en unidades codificadas.

Decodificando, tenemos:

$$\frac{9-7}{1-0} = \frac{C-7}{0,427314-0}$$

$$C = 7,855$$

Luego, la concentración óptima de H₂O₂ es de 7,855%. Para verificar si realmente el tiempo y la temperatura no son factores importantes en el pretratamiento del bagazo *in-natura* utilizando la concentración de H₂O₂ determinada, experimentos fueron realizados con variación del tiempo de reacción y de temperatura, manteniendo las demás condiciones fijas.

3.4 Estudio del tiempo de pretratamiento

Para determinar si el tiempo realmente no es un factor significativo en el pretratamiento con H₂O₂ a 7,855% (punto óptimo), fueron realizados experimentos variando el tiempo de reacción del pretratamiento, obteniendo el tiempo reaccional de 1 h. (Ver anexo I).

4. Estudio de la temperatura de pretratamiento

Para determinar si la temperatura realmente no es un factor significativo del pretratamiento con H₂O₂ a 7,855 %(v/v), experimentos fueron realizados donde la temperatura de reacción fue variada. Se realizaron 3 experimentos con temperaturas de 25, 60 y 70°C con tiempo de 1 h, así la temperatura reaccional de 25°C fue escogida para la realización del pretratamiento óptimo. (Ver anexo J).

4.1 Análisis del pretratamiento optimizado

Se realizó un ensayo de las condiciones óptimas del pretratamiento del bagazo *in-natura* con peróxido de hidrógeno alcalino. El tiempo de reacción de 1 h, temperatura de 25°C y concentración de peróxido de 7,855% fueron seleccionados como punto óptimo.

Para la liberación de los ART y glucosa, se efectuó la hidrólisis con las siguientes condiciones reaccionales fijas: 1 g de biomasa pretratada en cada combinación de niveles, volumen reaccional de 300 mL, 3,42 FPU de celulaza/g biomasa seca pretratada, 1,01 CBU de β-glucosidasa/g biomasa seca pretratada, pH 4,8, temperatura de 50°C y 100 rpm. La metodología experimental para la realización de la hidrólisis esta descrita en la sección 3.2.4.2 y la metodología experimental para la cuantificación de los azúcares se llevo acabo como fue descrita en la sección 3.2.4.3.

Al analizar la Figura 18, la reacción de liberación de azúcares se torna prácticamente estable después de 48 h de hidrólisis, con resultados de 0,887 g de ART y 0,691 g de glucosa liberadas en las condiciones óptimas.

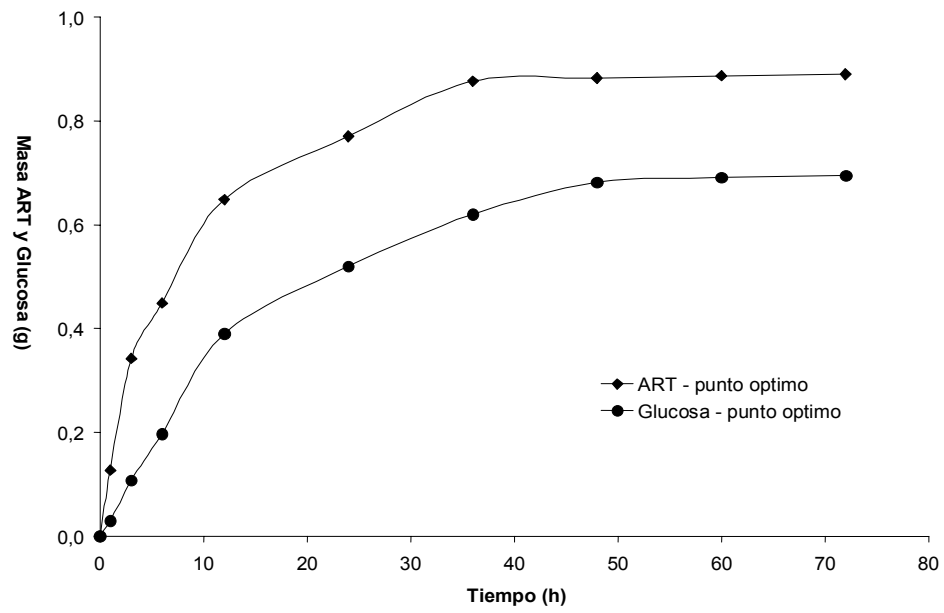


Figura 18. Perfil de hidrólisis en las condiciones óptimas del pretratamiento.



Figura 19. Muestras de bagazo antes y después del pretratamiento, y después de la hidrólisis en las condiciones optimas.

CONCLUSIONES

Se concluye que el tamaño de partícula del bagazo presenta poca influencia. Para la optimización del pretratamiento fue escogido el bagazo *in-natura* ya que presentó mayor liberación de glucosa (0,552 g) además de conseguir un mayor aprovechamiento de la materia prima como un todo, ya que gran parte del material (85,59%) se despreció en el estudio del pretratamiento utilizando el bagazo tamizado.

El pretratamiento con hidróxido de calcio proporcionó una baja remoción de hemicelulosa, esto se pudo visualizar por la pequeña disminución de masa en la biomasa pretratada. Después de someter a hidrólisis, se obtuvo una baja masa de glucosa liberada y una cantidad de masa considerable de ART. Con esto se puede concluir que las enzimas celulasas son capaces de hidrolizar además de la celulosa, los polímeros de hemicelulosa restantes después del pretratamiento.

El pretratamiento con peróxido de hidrogeno realizado al bagazo de caña da una eficiencia del 20 % mayor en la producción de glucosa comparado con el pretratamiento de hidróxido de calcio a condiciones de temperatura y tiempo mas suaves, teniendo así un proceso con costos de producción mas bajos.

RECOMENDACION

En cuanto al pretratamiento con hidroxido de calcio se hace la siguiente recomendación: optimizar las variables del proceso (temperatura, tiempo y concentración) contando con los equipos suficientes para llevar a cabo dicho pretratamiento en condiciones de operación altas, teniendo en cuenta los estudios realizados en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. OLIVÉRIO, J. L. HILST, A. G. P. DHR-Dedini Hidrólise Rápida – Revolutionary Process for Producing Alcohol from Sugar Cane Bagasse, XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, Janeiro/fevereiro, 2005.
2. SZCZODRAK, J., ILCZUK, Z., ROGALSKI, J., LEONOWICZ, A. Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 504-510 1986.
3. JOAQUIM, ANA PAULA. Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado).
4. O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 171-207, 1997.
5. FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.
6. PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. 3ª. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.
7. CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied biochemistry and biotechnology*, vol.63-65, pp. 3-19, 1997.
8. HSU, T. A., LADISCH, M. R., TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology* 10 (5), 315–319, 1980.
9. LADISCH, M. R., LIN, K. W., VOLOCH, M., TSAO, G. T. Process considerations in enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 82–102, 1983.
10. PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, 69-80, 2000.

11. AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health B*, 24(4), 421-433, 1989.
12. BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58, 1994.
13. DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55: 1-33, 1996.
14. PETERSON, L. G. GHOSE, T. K., GHOSH, P. Bioconversion of Cellulosic Substance. *Journal of Applied Chemical Biotechnology*, 28, 309-320, 1978.
15. THIEMANN, J. E., XAVIER, M. S. S. P., COLEN, G., GUIA, M. M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In *Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo* (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.
16. BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *biotechnol adv.*, 15: 583-620, 1997.
17. TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotech* 15, 160-167, 1997.
18. CHEUNG, S. W., ANDERSON, B. C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. *Bioresour. Technol.* 59, 81-96, 1997.
19. HUANG, X. L., PENNER, M. H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. *J. Agric. Food Chem.* 39, 2096-2100, 1991.
20. KRISHNA, S. H.; PRASANTHI, K.; CHOWDARY, G. V.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry*, 33, 825-830, 1998.
21. BARROS NETO, B., SCARMIN, I. S, BRUNS, R. E. Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

ANEXO A. DETERMINACION DE CONCENTRACION DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES (ART)

Las concentraciones de ART fueron determinadas de acuerdo con el método de ácido dinitrosalicílico. El método DNS se basa en la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitro salicílico al mismo tiempo en que el grupo aldehído del azúcar es oxidado a grupo carboxílico, con el desarrollo de la coloración rojiza siendo leída espectrofotométricamente. La Figura 20 muestra las reacciones ocurridas para la cuantificación de los ART.

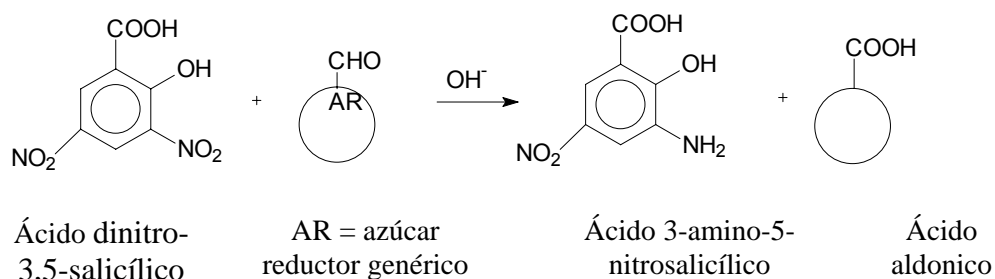


Figura 20. Reacción para la cuantificación de azúcares reductores totales por DNS.

Entre tanto, la equivalencia entre el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico producido y la cantidad de azúcar no es exacta, y diferentes azúcares producen diferente intensidad en el color desarrollado. Esto sugiere que la química de la reacción deberá ser mas compleja que la presentada, pudiendo estar relacionada con las reacciones de descomposición de azúcares en solución alcalina (MILLER, 1959).

El reactivo DNS se preparó según VILOCHE BAZAN (1993). Se Disolvió 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico en 1416 mL de agua. A esta mezcla se adicionó 7,6 mL de fenol fundido a 50°C y 8,3 g de meta-bisulfito de sodio. El reactivo fue guardado en un frasco ámbar para protegerlo de la luz. Paralelamente, fue preparada una solución de 15,1 g/L de tartalato de sodio y potasio tetrahidratado que fue guardado en otro frasco ámbar, siendo esta solución utilizada como estabilizante del color formado.

ANEXO B. CONSTRUCCION DE LA CURVA PATRON DE GLUCOSA PARA EL REACTIVO DNS

Para la construcción de una curva patrón para muestras con concentraciones conocidas de glucosa, fue utilizado el procedimiento de cuantificación de ART descrito en la sección 3.2.1.1. Fueron leídas en el espectrofotómetro con longitud de onda máxima de absorción 540 nm.

Se preparo de una solución existente de glucosa 1 mg/ml, soluciones de glucosa de 0 a 10 mg/mL, con intervalos de 0,1 mg/mL, que después reaccionaron por el método de DNS y posteriormente leídas en el espectrofotómetro, obteniendo las absorbancias de cada concentración de glucosa lo cual se puede observar en la tabla 11 y se graficó concentración de glucosa (azúcar reductor) en función de absorbancia, mostrada en la figura 21.

Tabla 11. Absorbancia de solución de glucosa después de la reaccion con DNS

[Glucosa] (mg/mL)	[Glucosa] en la reacción de DNS (mg/mL)	Absorbancia
0,10	0,01	0,046
0,20	0,02	0,159
0,30	0,03	0,263
0,40	0,04	0,366
0,50	0,06	0,469
0,60	0,07	0,547
0,70	0,08	0,668
0,80	0,09	0,754
0,90	0,10	0,839
1,00	0,11	0,924

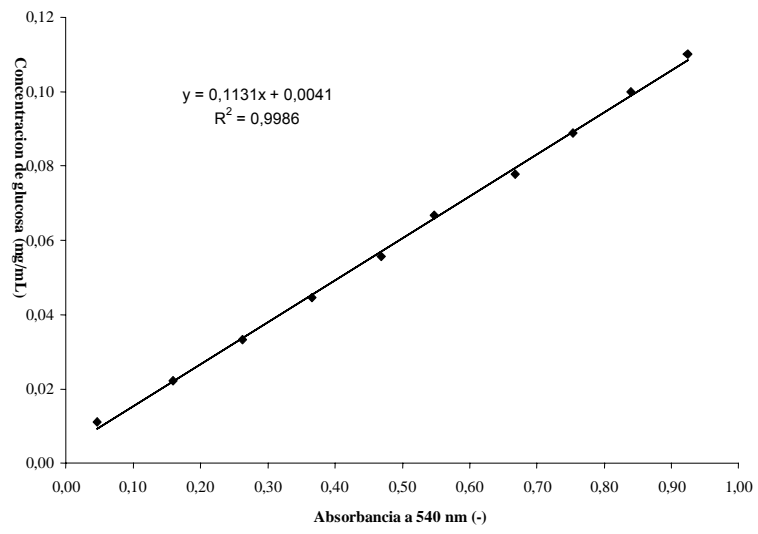


Figura 21. Curva patron de glucosa (azúcar reductor).

ANEXO C. HUMEDAD DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Para el cálculo de humedad teórica en la muestra se utilizó la siguiente ecuación.

$$a.s\% = \frac{\text{masa de bagazo humedo} - \text{masa de bagazo seco}}{\text{masa de bagazo humedo}} * 100 \quad (2)$$

Donde a.s. representa la masa absolutamente seca del material. El bagazo fue seco y analizado en relación a la humedad teórica.

Tabla 12. Porcentaje de humedad del bagazo de caña de azúcar inicialmente

Masa del Bagazo húmedo (g)	Masa de Bagazo seco. (g)	%Bagazo seco	% humedad
6,6196	2,6258	39,67	60,33
5,6710	2,2419	39,53	60,47
6,0063	2,4140	40,19	59,81
Media		39,80	60,20

Tabla 13. Porcentaje de humedad de bagazo de caña de azúcar después de 48 h de secado.

Masa de Bagazo húmedo (g)	Masa de Bagazo seco. (g)	%Bagazo seco	% humedad
6,23760	5,9294	95,06	4,49
5,96766	5,6722	95,05	4,95
6,50210	6,1955	95,28	4,72
Média		95,13	4,87

Después de 48 h de secado, la humedad teórica fue 4,87%, el bagazo permaneció 24 h a temperatura ambiente no teniendo cambios significativos en el porcentaje de humedad (5,01%).

ANEXO D. ANALISIS GRANULOMETRICO DEL BAGAZO DE CAÑA

Después del proceso de secado y almacenado del bagazo en el refrigerador, parte del material fue sometido a una separación granulométrica por un proceso de tamizado, pasando a ser denominado bagazo tamizado.

El bagazo fue adicionado a una serie de tamices de 12, 16, 24, 32, 42, 60 y 80, teniendo fracciones másicas, retenida, acumulada y calculada. Los análisis fueron triplicados y el valor medio de estos resultados fue reportado en la tabla 14.

Tabla 14. Fracción másica retenida y acumulada.

Tamices	dp (mm)*	\bar{d}_p da partícula (mm)	Media de la masa de bagazo retenida (g)	Fracción másica retenida (%)	Fracción másica acumulada (%)
+12	>1,397	1,689	75,23	85,59	100,00
-12+16	0,991	1,194	2,77	3,13	14,41
-16+24	0,701	0,846	2,50	2,82	11,28
-24+32	0,495	0,598	1,53	1,72	8,46
-32+42	0,351	0,423	1,60	1,77	6,74
-42+60	0,248	0,300	1,57	1,75	4,97
-60+80	0,175	0,212	1,30	1,38	3,21
-80	<0,175	0,150	1,73	1,83	1,83

*Valores tomados del Apéndice C-8, PERRY *et al.* (1997).

Después de estos valores, se gráfico el porcentaje de fracción másica retenida en función del diámetro medio de la partícula como muestra la Figura 2.

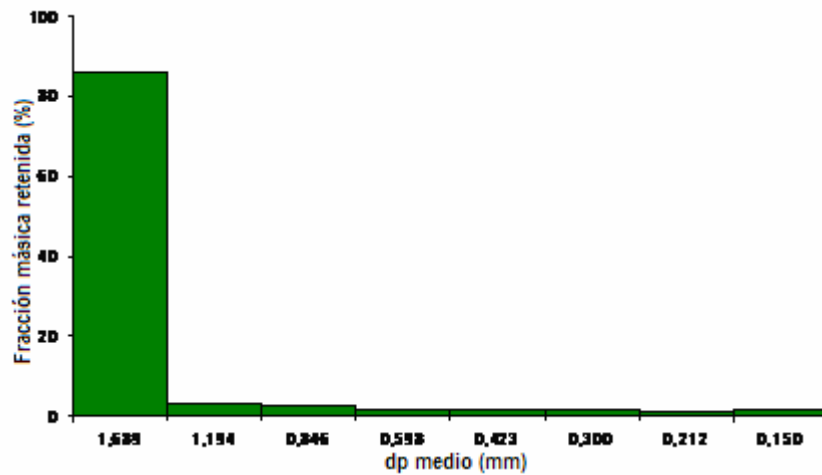


Figura 22. Porcentaje de fracción másica retenida en función del diámetro medio de la partícula.

Se observa que la mayor parte del bagazo de caña utilizado en nuestros experimentos como bagazo *in-natura* (bagazo sin proceso de tamizado), cerca de 85,6%, presenta un diámetro medio superior a 1,689 mm.

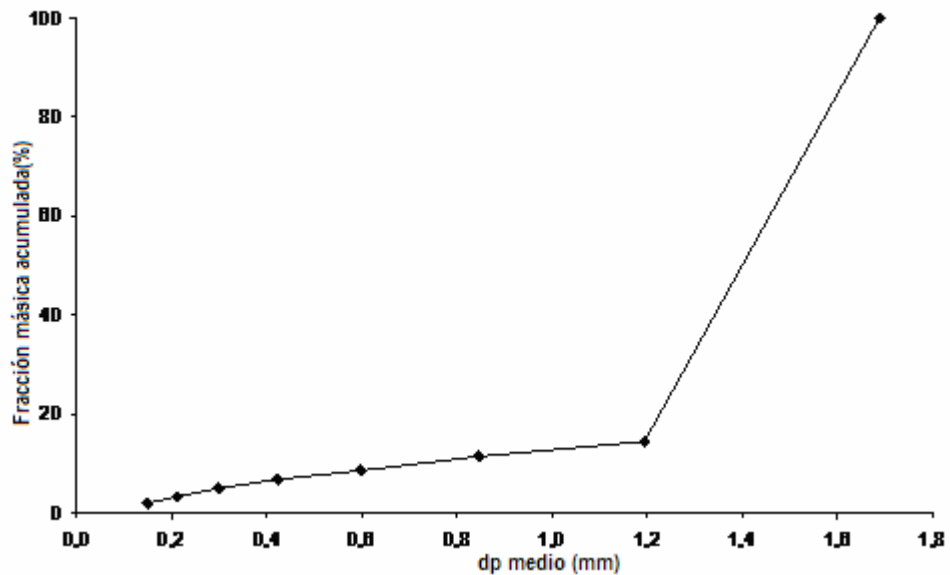


Figura 23. Porcentaje de fracción másica acumulada en función del diámetro medio de la partícula



Figura 24. Bagazo in-natura y tamizado

ANEXO E. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LA B-GLUCOSIDASA

Para la β -glucosidasa, la medida de actividad fue determinada a través de una solución de celobiosa 15 mmol/L y se expresa en unidades de celobiosa (CBU) por volumen de enzima original, recomendado por la IUPAC (WOOD e BHAT, 1988). La unidad de la actividad de β -glucosidasa (CBU) se basa en la liberación de exactamente 1,0 mg de glucosa, esto es, 0,5/0,18016 μmol de celobiosa convertida por 1,0 mL de enzima diluida en 30 minutos de reacción. La Ecuación 3 muestra el cálculo de la actividad.

$$\begin{aligned} \text{CBU/mL} &= \frac{0,5}{(0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \\ \text{CBU/mL} &= \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]} \end{aligned} \quad (3)$$

Para la determinación de la actividad enzimática, se partió de una solución de enzima β -glucosidasa de dilución 1:1000. Después de esta solución, fue necesario realizar una solución de tampón de citrato 0,05 mol/L pH 4,8 el cual fue preparado de la siguiente forma: 10,5 g de ácido cítrico monohidratado fueron disueltos en 37,5 mL de agua destilada. Seguidamente, se adicionó hidróxido de sodio hasta que la solución llegará a un pH de 4,3 (aproximadamente 2,5 g). El volumen de solución fue completado a 50 mL y fue medido el pH obteniendo 4,5. Para obtener la concentración de 0,05 mol/L, la solución de 50 mL fue transferida para un balón volumétrico de 1 L, aforando con agua destilada. En este momento el pH subió para 4,8.

Después de preparar la solución de citrato se procedió a realizar 4 diluciones a partir de la dilución 1:1000 como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Concentraciones de soluciones de enzima β -glucosidasa

Dilución de enzima	Volumen de tampón (mL)	Volumen diluida (mL)	enzima 1:1000 [enzima]
2000	5,00	5,00	0,0005
3333,33	7,00	3,00	0,0003
5000	8,00	2,00	0,0002
10000	9,00	1,00	0,0001

Para cada tubo de ensayo, se adiciono 1,0 mL de cada una de las diluciones de la enzima y estos fueron colocados en un baño termostático a 50°C para que la temperatura se equilibrara. Después de 10 minutos, fue adicionado en cada tubo 1,0 mL de solución de celobiosa 15 mmol/L y los tubos fueron encubados por 30 minutos. Al término de la reacción, los tubos fueron inmersos en un baño de agua hirviendo por exactamente 5 minutos y posteriormente transferidos para un baño de hielo.

Para la determinación de la concentración de glucosa liberada por cada solución de enzima diluida, se utilizo el método de cuantificación *Glucosa GOD-PAP* como se describió en la sección 3.2.3.1. Al final de cuantificar la glucosa, se adiciono 0,2 mL de ácido sulfúrico 72% en cada tubo de ensayo para garantizar que la reacción halla sido terminada.

También fueron preparados 4 tubos control de enzima, donde se adicionó 1,0 mL de cada una de las diluciones de la enzima y 1,0 mL de tampón de citrato. Al final del tiempo reaccional, se aplicó el método de cuantificación de Glucosa *GOD-PAP*. Al tubo control del sustrato se adicionó 1,0 mL del sustrato celobiosa y 1,0 mL del tampón citrato que al final de 30 minutos de reacción también fue analizado por el método enzimático Glucosa *GOD-PAP*.

Después de las lecturas de absorbancia mostradas en la tabla 16, se trazó una recta donde se relaciona la concentración de la enzima en cada una de las diluciones en función de la masa de glucosa liberada por 1,0 mL de esa enzima diluida, determinando así la actividad enzimática de la β -glucosidasa.

Tabla 16. Valores de absorbancia y masas de glucosa liberadas por cada dilución de enzima analizada.

[enzima]	Absorbancia muestra	Absorbancia enzima	Absorbancia sustrato	Absorbancia final	Glucosa (mg)
0,00050	0,005	0,000	0,000	0,005	2,50
0,00030	0,006	0,003	0,001	0,002	1,00
0,00020	0,004	0,002	0,001	0,001	0,50
0,00010	0,003	0,003	0,000	0,000	0,00

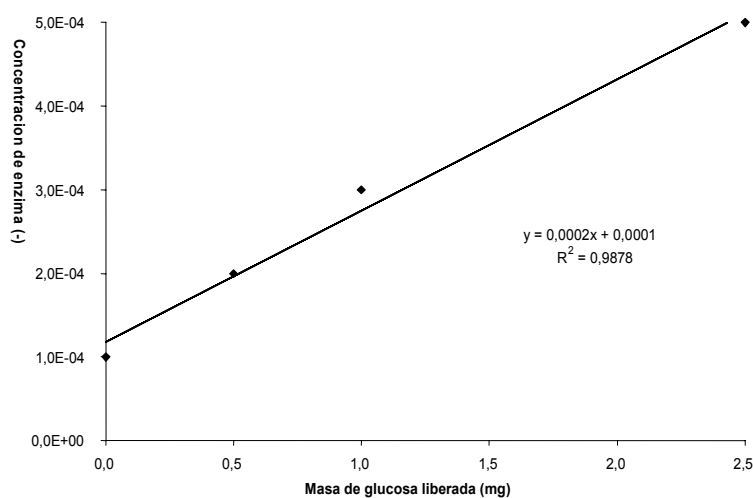


Figura 25. Gráfico de concentración de enzima en cada dilución en función de la masa de glucosa liberada por 1,0 mL de enzima diluida en condiciones reaccionales predeterminadas.

Según WOOD yBHAT (1988), una unidad de actividad de β -glucosidasa (CBU) se basa en la liberación de exactamente 1,0 mg de glucosa, esto es, 0,5/0,18016 μ mol de celobiosa, convertida por 1,0 mL de enzima diluida en 30 minutos de reacción. Siendo así, con la ecuación de la recta obtenida en la Figura 26, fue posible determinar la concentración de enzima necesaria para liberar exactamente 1,0 mg de glucosa:

$$\begin{aligned}
 [\text{enzima}] &= 0,0002 \cdot (\text{masa de glucosa liberada}) + 0,0001 \\
 [\text{enzima}] &= 0,0002 \cdot 1,0 + 0,0001 \\
 [\text{enzima}] &= 0,0003
 \end{aligned}$$

Con el valor de concentración de enzima determinada, se calculo la actividad enzimática de la β -glucosidasa a través de la Ecuación 3.

$$\text{Actividad de la } \beta\text{-glucosidasa} = \frac{0,5}{(0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30.0,0003)} = 308,37 \text{ CBU/mL}$$

ANEXO F. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA CELULASA

Para la enzima celulasa, la actividad fue determinada como actividad de papel filtro (FPA) y se expresa en unidades de filtro de papel (FPU – “Filter Paper Units”) por volumen de enzima original, recomendado por la IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD e BHAT, 1988; ADNEY e BAKER, 1996). Durante las reacciones, parte de la concentración de glucosa, puede ser procedente de las enzimas y/o del sustrato, para esto se procede a realizar: los tubos de control, que consisten (a) en la enzima sin sustrato y (b) en el sustrato sin enzima, son incluidos durante los análisis de las muestras y tienen sus valores de absorbancia substraídos de los valores de las absorbancia leídas en cada uno de los tubos reaccionales.

Así, la cuantificación de la glucosa a través del método DNS envuelve tres categorías de reacciones: tubos de las muestras para ser cuantificadas; tubos del blanco reaccional, para cercar el espectrofotometro y los tubos control de la enzima y sustrato.

Para la determinación de la actividad enzimática, se parte de solución de celulasa de dilución de 1:20. A partir de esta solución se parte de otras 5 soluciones, para efectuar 5 nuevas diluciones en tampón de citrato 0,05 mol/L pH 4,8 como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Concentración de soluciones diluídas de la enzima celulasa.

Dilución de enzima	Volumen de tampón (mL)	Volumen enzima diluída 1:20 (mL)	[enzima]
100	8,00	2,00	0,01000
133,33	8,50	1,50	0,00750
200	9,00	1,00	0,00500
400	9,50	0,50	0,00250
800	9,75	0,25	0,00125

En cada tubo de ensayo se adiciono 1,0 mL de tampón de citrato y enseguida, 50 mg de papel filtro enrollado, tomando el debido cuidado para que este

completamente saturado por el tampón.. Los tubos fueron colocados en un baño termo estático a 50°C. Después de 10 minutos, se adicionó 0,5 mL de cada una de las enzimas previamente diluidas en tampón citrato y los tubos fueron encubados por exactamente 60 minutos.

Al final de este período, los tubos fueron removidos y la reacción enzimática detenida inmediatamente con la adición de 1,5 mL de reactivo DNS. Los tubos fueron hervidos por 5 minutos a 95°C y posteriormente transferidos para un baño de hielo fundente. Al final, se adiciono 10,5 mL de la solución estabilizante y los tubos fueron invertidos para la homogenización de la solución. Cuando la pulpa de papel restante de la reacción de hidrólisis fue terminada, el color formado fue medido en el espectrofotómetro.

Para la preparación del tubo del blanco reaccional, se adiciono 1,5 mL del tampón de citrato y después de 60 minutos de reacción se aplico el método DNS descrito en la sección 2.2.2.2. Para la preparación de los tubos control de la enzima, se adiciono 1,0 mL de tampón de citrato y 0,5 mL de cada una de las diluciones de la enzima, totalizando 5 tubos control, que al final del tiempo reaccional, se detuvieron las reacciones con la adición del DNS, . El tubo control de substrato fue preparado adicionando 1,5 mL de tampón citrato y 50 mg de filtro de papel enrollado, que al final de 60 minutos, también fue analizado por el método DNS.

Los resultado de absorbancias son mostrados en la tabla 12, posteriormente se trazo una recta donde relaciona la concentración de enzima en cada una de las diluciones en función de la masa de glucosa liberada por 0,5 mL de esta enzima diluida, determinando así la actividad enzimática de la celulaza mostrado en la figura 26 .

Tabla 18: Valores de absorbancia y masa de glucosa liberada por cada dilución de la enzima analizada.

[enzima]	Absorbancia muestra	Absorbancia enzima	Absorbancia sustrato	Absorbancia final	Glucosa (mg)
0,01000	0,4978	0,0000	0,0033	0,4945	2,2297
0,00750	0,4226	0,0000	0,0033	0,4193	1,9354
0,00500	0,3416	0,0000	0,0033	0,3383	1,6185
0,00250	0,2328	0,0000	0,0033	0,2295	1,1928
0,00125	0,1273	0,0000	0,0033	0,1240	0,7800

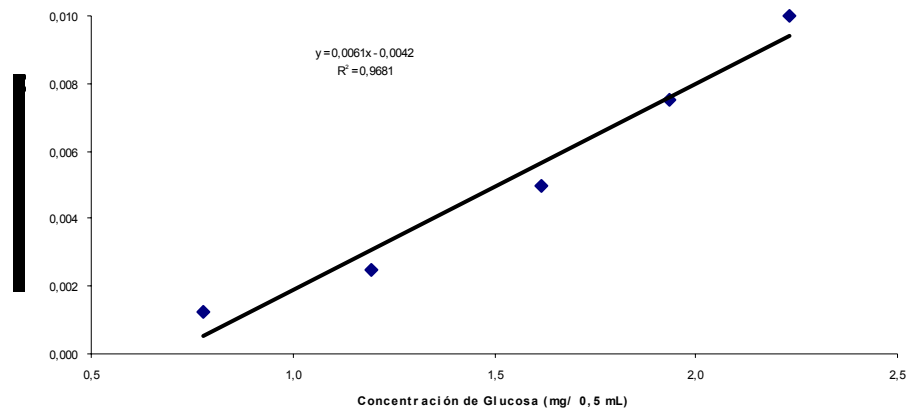


Figura 26. Gráfico de la concentración de la enzima en cada dilución en función de la masa de glucosa liberada por 0,5 mL de enzima diluida en condiciones reaccionales predeterminadas.

Para la celulaza, una unidad de la actividad de enzima (FPU) es basada en la liberación de exactamente 2,0 mg de glucosa equivalente, esto es, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel filtro por 0,5 mL de enzima diluida en 60 minutos de reacción. La Ecuación 12 muestra el cálculo de la actividad.

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (4)$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]}$$

Siendo así, con la ecuación de la recta obtenida en la Figura 26, es posible determinar la concentración de enzima necesaria para liberar exactamente 2,0 mg:

$$[\text{enzima}] = 0,0061 \cdot (\text{masa de glucosa liberada}) - 0,0042$$

$$[\text{enzima}] = (0,0061 \cdot 2,0) - 0,0042$$

$$[\text{enzima}] = 0,0080$$

Con el valor de la concentración de la enzima determinada, se puede calcular la actividad enzimática de la celulaza a través de la Ecuación 4.

$$\text{Actividad de la celulaza} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot 0,008)} = 46,26 \text{ FPU/mL}$$

ANEXO G. PERFIL DE HIDRÓLISIS PARA EL PRETRATAMIENTO CON $\text{Ca}(\text{OH})_2$

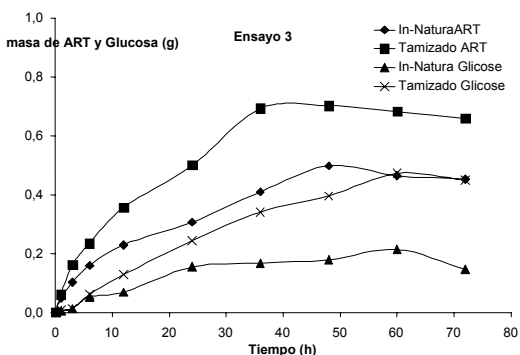


Figura 27. Perfil de hidrólisis del ensayo 3.

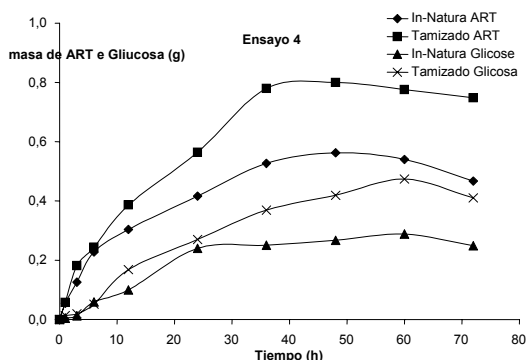


Figura 28. Perfil de hidrólisis del ensayo 4.

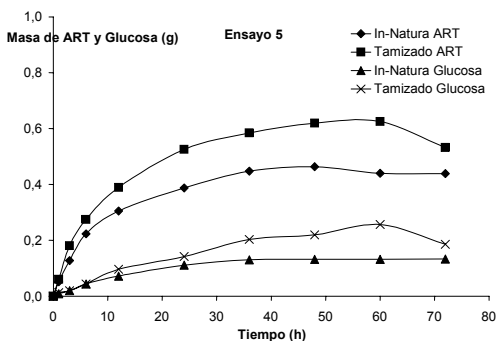


Figura 29 Perfil de hidrólisis del ensayo 5.

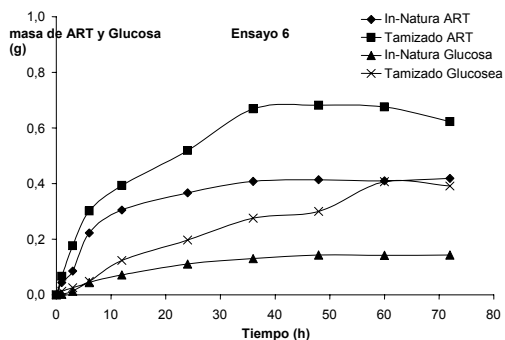


Figura 30. Perfil de hidrólisis del ensayo 6.

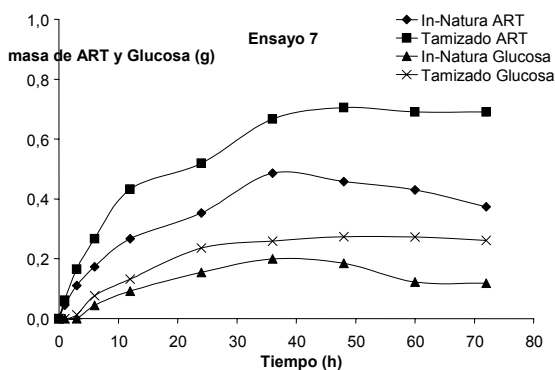


Figura 31 Perfil de hidrólisis del ensayo 7.

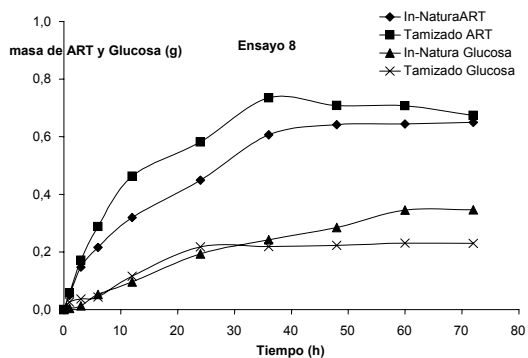


Figura 32. Perfil de hidrólisis del ensayo 8.

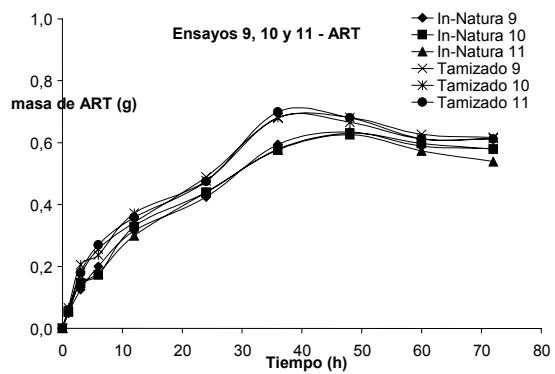


Figura 33. Perfil de hidrólisis de los ensayo 9, 10 y 11 para ART.

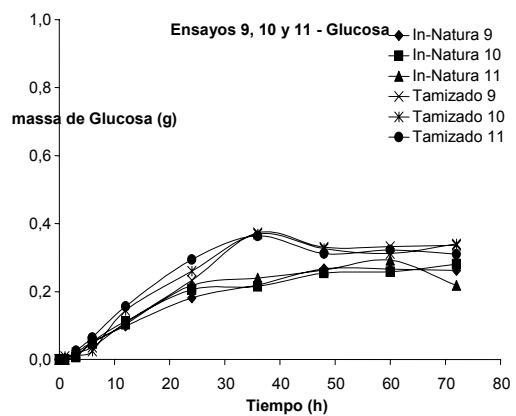


Figura 34. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para glucosa.

ANEXO H. PERFIL DE HIDROLISIS PARA EL PRETRATAMIENTO CON H_2O_2

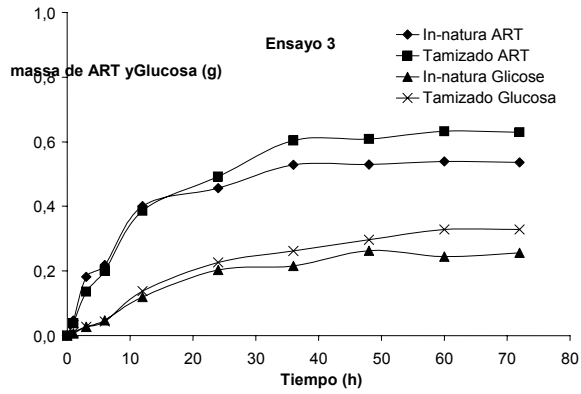


Figura 35. Perfil de hidrólisis del ensayo

3.

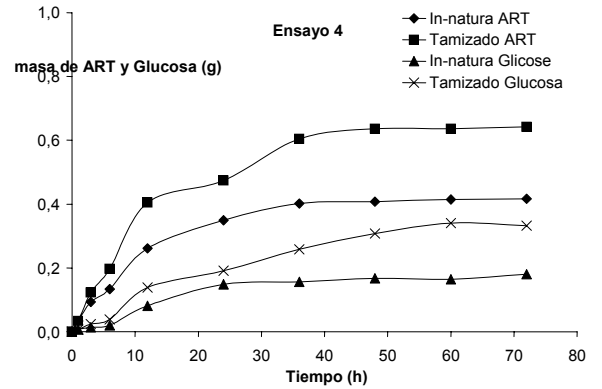


Figura 36. Perfil de hidrólisis del ensayo

4.

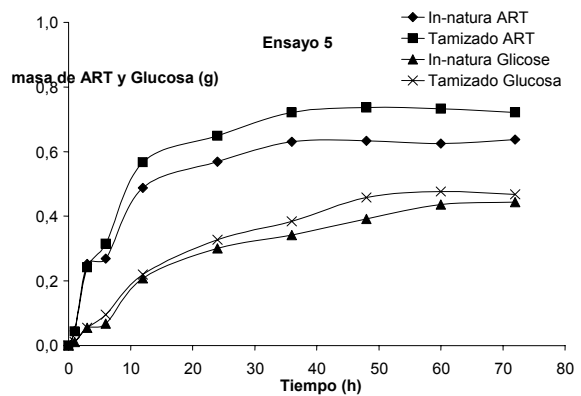


Figura 37. Perfil de hidrólisis del ensayo

5.

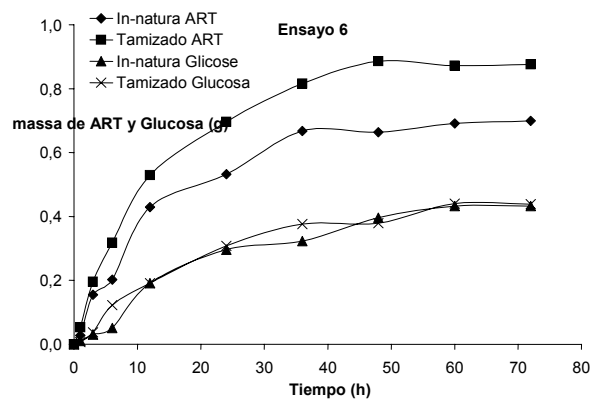


Figura 38. Perfil de hidrólisis del ensayo

6.

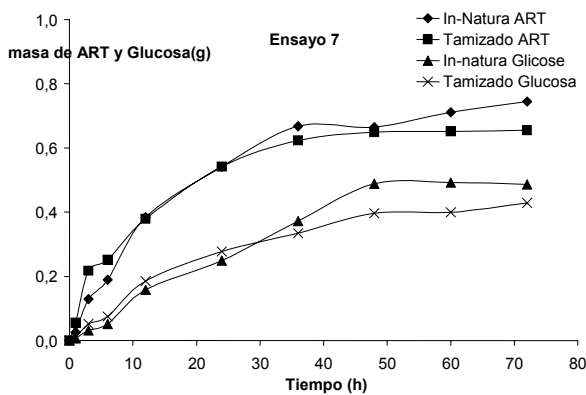


Figura 39. Perfil de hidrólisis del ensayo

7.

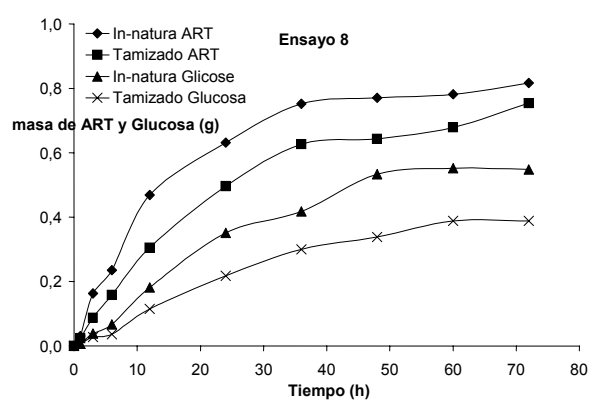


Figura 40. Perfil de hidrólisis del ensayo

8.

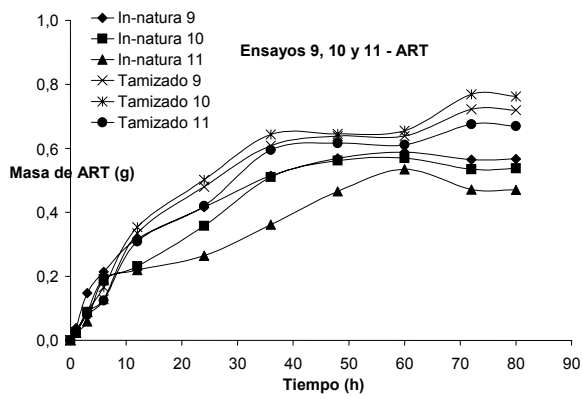


Figura 41. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para ART.

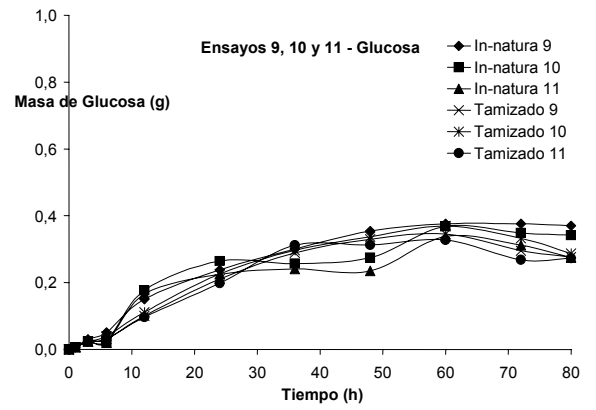


Figura 42. Perfil de hidrólisis de los ensayos 9, 10 y 11 para glucosa.

ANEXO I. ESTUDIO DEL TIEMPO DEL PRERATAMIENTO

Se realizó 4 experimentos con tiempos de reacción de 1, 15, 19 y 24 h, como se muestra en la tabla 19. La metodología experimental del pretratamiento fue llevada a cabo igual a la sección 3.2.4.1.

Tabla 19. Valores de las variables en cada uno de los ensayos.

Ensayo	Substrato	Tempo (h)	Temperatura (°C)	[H ₂ O ₂] %
1	N	1	50	7,855
2	N	15	50	7,855
3	N	19	50	7,855
4	N	24	50	7,855

Para la liberación de los ART y glucosa, se efectuó la hidrólisis con las siguientes condiciones reaccionales fijas: 1 g de biomasa pretratada en cada combinación de niveles, volumen reaccional de 300 mL, 3,42 FPU de celulasa/g biomasa seca pretratada, 1,01 CBU de β -glucosidasa/g biomasa seca pretratada, pH 4,8, temperatura de 50°C y 100 rpm. La metodología experimental para realización de la hidrólisis está descrita en la sección 3.2.4.2. La figura 43. Muestra la masa antes y después de cada condición de pretratamiento y masa antes y después de la hidrólisis por 72 horas en cada condición estudiada.

Analizando la Figura 43.

75

Figura podemos percibir que en todos los ensayos hubo una pérdida de masa después del pretratamiento y esta fue de más del 50%. El ensayo 3 presentó la mayor pérdida de masa durante el pretratamiento, aproximadamente 58% del bagazo, y el ensayo 1 la menor pérdida, aproximadamente 55%. Esto lleva a entender que hubo una pérdida considerable de hemicelulosa. En relación a la hidrólisis, la masa restante después del proceso presentó menor en el ensayo 1, donde ocurrió la mayor hidrólisis, aproximadamente 83% de residuo siendo

hidrolizado. El peor resultado fue encontrado en el ensayo 4, donde 74% del residuo fue hidrolizado.

Analizando los 4 ensayos, la masa de ART y glucosa liberada en función del tiempo de hidrólisis. A Figura 76 muestra estos perfiles de hidrólisis para cada uno de los ensayos. La metodología experimental para la cuantificación de los azúcares liberados en el medio reaccional está descrita en la sección 3.2.4.3.

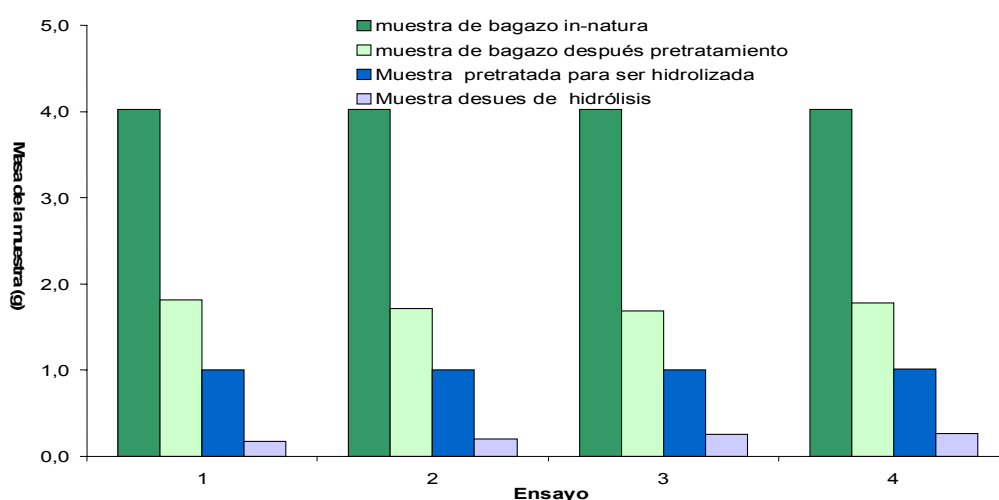


Figura 43. Masa inicial y final de pretratamiento de bagazo *in-natura*, masa inicial y final después del proceso de hidrólisis. Análisis del tiempo reaccional.

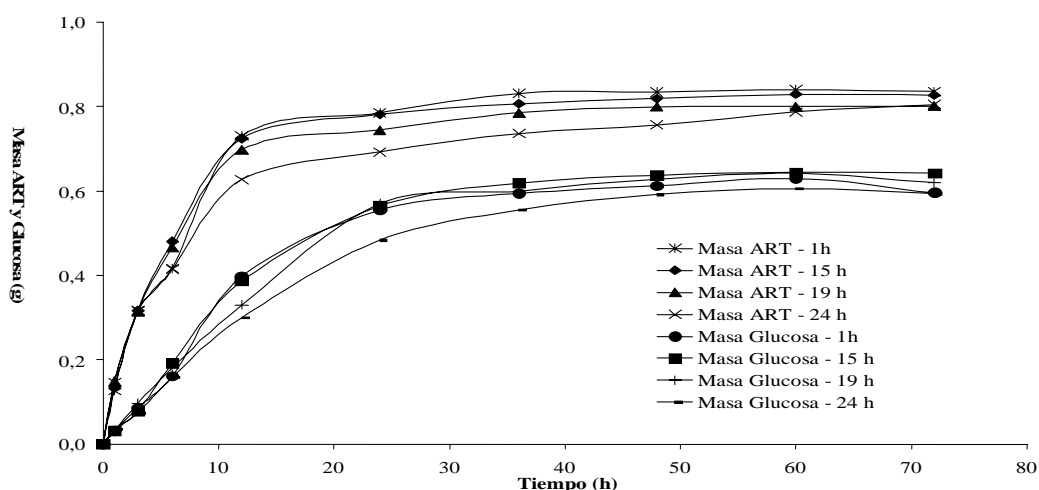


Figura 44. Perfil de hidrólisis para cada uno de los ensayos – variación del tiempo de pretratamiento.

Al analizar la figura 43 podemos percibir que en todos los ensayos, la masa de glucosa liberada fue prácticamente la misma. El tiempo reaccional de 24 h mostró una ligera queda nos resultados, tanto de glucosa cuanto de ART. Así, podemos percibir que realmente el tiempo reaccional del pretratamiento no es un factor significativo.

Una de las explicaciones posibles de la no influencia del tiempo reaccional es que durante el pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino, hay una gran liberación de O_2 debido a la descomposición del peróxido. En cuanto la liberación de O_2 está ocurriendo, es señal que aun exista H_2O_2 siendo descompuesto en la reacción. La liberación de O_2 sucede por aproximadamente 45 minutos, siendo que después de este intervalo, el tiempo reaccional no presenta más importancia.

Así, el tiempo reaccional de 1 h fue escogido para la realización del pretratamiento óptimo y consecuentemente será utilizado en el proceso de optimización de la carga enzimática.

ANEXO J. ESTUDIO DE LA TEMPERATURA DEL PRETRATAMIENTO

La metodología experimental del pretratamiento se realizó según la sección 3.2.4.1. La Tabla 29 muestra los valores de las variables para cada ensayo del bagazo *in-natura* (N).

Tabla 20. Valores de variables en cada uno de los ensayos.

Ensayo	Sustrato	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	[H ₂ O ₂] %
1	N	1	25	7,855
2	N	1	60	7,855
3	N	1	70	7,855

Para la liberación de los ART y glucosa, se efectuó la hidrólisis con las siguientes condiciones reaccionales fijas: 1 g de biomasa pretratada en cada combinación de niveles, volumen reaccional de 300 mL, 3,42 FPU de celulasa/g biomasa seca pretratada, 1,01 CBU de β -glucosidasa/g biomasa seca pretratada, pH 4,8, temperatura de 50°C y 100 rpm. La metodología experimental para realización de la hidrólisis está descrita en la sección 3.2.4.2. La Figura 45 muestra la masa antes y después de cada condición de pretratamiento, antes y después de la hidrólisis por 72 horas en cada una de las condiciones del ensayo.

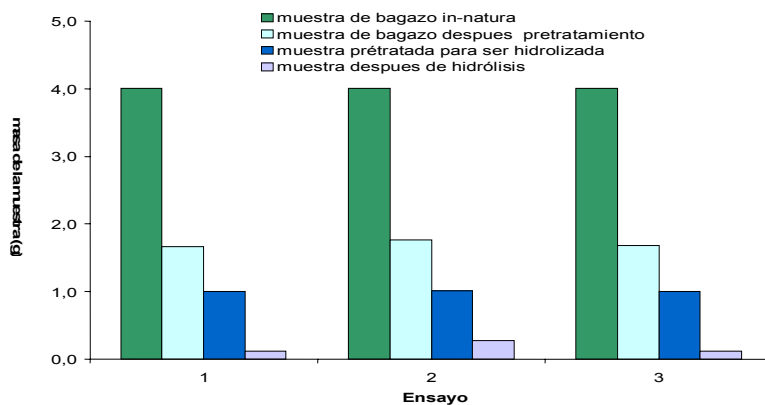


Figura 45. Masa inicial y final del pretratamiento del bagazo *in-natura* y masa inicial y final después del proceso de hidrólisis. Análisis de la temperatura reaccional.

Analizando la Figura 45 podemos observar que el ensayo 1 y 3 presentó una misma pérdida de masa (58%) en cuanto el ensayo 2 la pérdida fue menor, aproximadamente 56%. En relación a la hidrólisis el mismo efecto puede ser observado. La masa restante después al proceso se presentó en menor cantidad de masa en los ensayos 1 y 3, teniendo un 87% de la masa hidrolizada, en cuanto al ensayo 2 la masa hidrolizada fue de 73%. Analizando los 3 ensayos, podemos observar el perfil de hidrólisis para cada ensayo, como muestra la figura 46. La metodología experimental para la cuantificación de los azúcares liberados en el medio reaccional fue descrita en la sección 3.2.4.3.

Al analizar la Figura 45 podemos observar que para los ensayos 1 y 3 (temperatura de 25 y 70°C) la masa de ART y glucosa liberada durante toda la hidrólisis fue prácticamente la misma. El ensayo 2 (temperatura de 60°C) presentó una baja liberación de ART y glucosa.

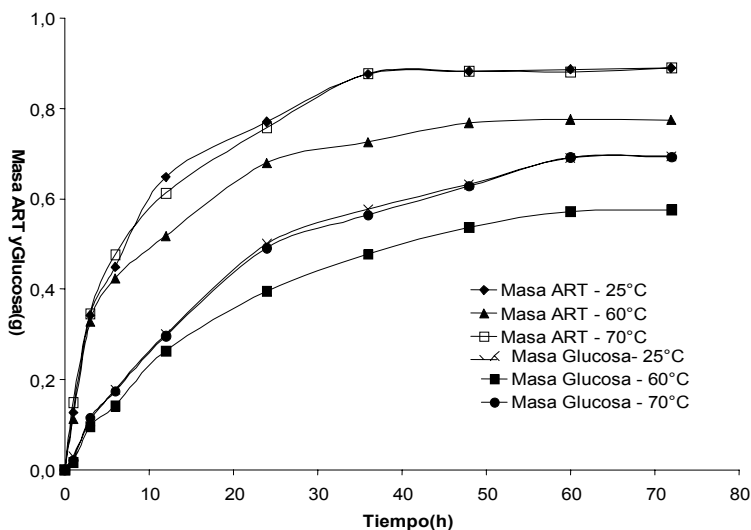


Figura 46. Perfil de hidrólisis para cada uno de los ensayos – variación de la ento.

Así, tanto para temperaturas altas (70°C) como para temperaturas bajas (25°C) conseguimos óptimos resultados en la hidrólisis del residuo pretratado. Luego, la temperatura reaccional de 25°C fue escogida para la realización del

pretratamiento óptimo y consecuentemente utilizado en el proceso de optimización de la carga enzimática, visto que así tendremos un menor gasto de energía en el proceso.

ANEXO K. METODO ANALITICO: CALORIMETRÍA Y ESPECTROFOTOMETRÍA.

La calorimetría y la espectrofotometría pueden ser conceptuadas como un procedimiento analítico a través del cual se determina la concentración de especies químicas mediante la absorción de energía radiante (Luz).

La absorbancia puede ser influenciada por la naturaleza del solvente, pH de la solución, temperatura, concentración de electrolitos y presencia de sustancias interferentes.

Según SKOOG *et al.* (2002), hay algunas características importantes del método espectrofotométrico:

1. Amplia aplicación a sistemas orgánicos e inorgánicos;
2. Selectividad moderada y alta;
3. Buena exactitud;
4. Facilidad y conveniencia de adquisición de datos.

Para saber la concentración del analito de interés en una solución, es necesario, antes de todo, hacer una curva patrón que relaciona la absorbancia referente a cada concentración conocida del analito.